

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑲ Anmeldenummer: 87111382.5

⑤① Int. Cl.4: **A61K 47/00**, **A61K 9/10**

⑳ Anmeldetag: 06.08.87

Die Bezeichnung der Erfindung wurde geändert
(Richtlinien für die Prüfung im EPA, A-III, 7.3).

③① Priorität: 07.08.86 DE 3626700

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
02.03.88 Patentblatt 88/09

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑦① Anmelder: **MEDICE Chem.-Pharm. Fabrik**
Pütter GmbH & Co. KG
Kuhloweg 37-39
D-5860 Iserlohn/Westfalen(DE)

⑦② Erfinder: **Paradies, Henrich,**
Prof.Dr.med.Dr.rer.nat.
Kuhloweg 38
D-5860 Iserlohn(DE)

⑦④ Vertreter: **Reinhard, Skuhra, Weise**
Leopoldstrasse 51
D-8000 München 40(DE)

⑤④ **Kationische Tenside enthaltende Arzneimittel.**

⑤⑦ Es wird eine pharmazeutische Zubereitung offenbart, die aufgebaut ist aus einer Micelle, bestehend aus einem kationischen Tensid mit einem einwertigen Anion und einem hydrophoben pharmazeutischen Wirkstoff, dispergiert in einem Lösungsmittel, dessen pH-Wert kleiner ≤ 7 ist, wobei die kritische Micellbildungskonzentration (KMK) im Bereich von $1,0 \cdot 10^{-7}$ bis $1,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter liegt. Außerdem wird eine Anzahl neuer kationischer Tenside (Heterozyklen) offenbart. Die offenbarten Zubereitungen haben insbesondere den Vorteil, daß durch die Erhöhung der Hydrophobizität der Alkyl-bzw. Aryl-Kette bzw. Restes am N^+ -Tensid die Membran-Permeabilität erhöht wird, so daß die pharmazeutischen Wirkstoffe quantitativ passiv in das Zytosol übertreten können.

EP 0 257 400 A2

BEST AVAILABLE COPY

Pharmazeutische Zubereitungen

Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Zubereitungen, bekannte kationische Tenside als Bestandteile der pharmazeutischen Zubereitung, neue chemische Verbindungen (kationische Tenside), die insbesondere als Bestandteil der pharmazeutischen Zubereitungen verwendet werden, Verfahren zur Herstellung der pharmazeutischen Zubereitung und Verfahren zur Herstellung der bekannten und neuen chemischen Verbindungen (kationischen Tensiden).

Stand der Technik und dessen Nachteile:

Micellen in wässriger Lösung, sowohl nichtionische, kationische und anionische sind in der Literatur in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben worden. (Mittal, K.L. (1977) Micellization, Solubilization and microemulsions, Plenum Press, New York. - Mittal, K.L. (1979), Solution Chemistry of Surfactants, Plenum Press, New York. - Menger, F.M. (1977). In Bioorganic Chemistry III. Macro-and Multicomponent Systems (E.E. Van Tancelen, Ed.), Academic Press, New York. - Menger, F.M. (1979a) Acc. Chem. Res. 12, 111-117. On the Structures of Micelles. - J.H. Fendler, E.J. Fendler (1975) Catalysis in micellar and macromolecular Systems, Academic Press.) Ihr Aufbau und ihre galenische, medizinische und technische Verwendung ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So ist die antiseptische Wirkung von Cetylpyridiniumchlorid, Benzethoniumchlorid und Benzalkoniumchlorid oder deren Bromide bekannt. Auch, daß sie in geringen Konzentrationen bakterizide Wirkung in vitro gegenüber einer großen Anzahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien zeigen, wobei die gramnegativen wesentlich empfindlicher als die grampositiven reagieren. Auch sind bestimmte gramnegative Bakterien resistent gegenüber diesen quartären Ammoniumbasen, z.B. Pseud. cephalia, Mycobakt. tuberculosis.

Normalerweise haben kationische Micellen in wässriger Phase zusätzlich in ihrem hydrophoben Kern, der weitgehend durch die aliphatische Kette und ihre Länge bestimmt wird, eine hydrophobe-hydrophile Grenzschicht (Stermlayer), die hydratisiert ist und z.T. die Gegenionen beherbergt. Die Größe dieser Grenzschicht liegt im allgemeinen zwischen 7-10 Å. Außerdem sind sie noch mit der Guy-Chapman-Layer von 10-20 Å umgeben, die nicht elektrostatisch gebundene Gegenionen, z.B. Cl^- , Br^- , HSO_4^- und unstrukturisiertes Wasser enthalten. Nur die Konzentrationen der Gegenionen als auch andere Ionen bewirken eine Senkung der kritischen Micellenbildungs-Konzentration (KMK) bei konstanter Temperatur, Druck und chemischen Potentials, wobei die Natur der Gegenionen die Form und Größe der Micellen in wässriger Phase bestimmen können. Dies bewirken allerdings nur die Fraktion von Gegenionen, welche im Stern-layer in der Nähe des quartären Stickstoffs sich befinden.

Die reinen, bislang bekannten kationischen quartären Ammoniumbasen - offiziell auch als Invertseifen bezeichnet - haben nur eine begrenzte und nicht spezifische antimikrobielle Wirkung (siehe z.B. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 4. Auflage. B.I. Wissenschaftsverlag, 1983, S. 616). Daher sind ihre Einsetzbarkeit z.B. als Konservierungsmittel oder als Desinfiziens in den operativen Fächern der Medizin oder auf Infektionsstationen (Antiseptika) begrenzt, trotz ihrer geringen Toxizität. Domagk erkannte 1935 (siehe Wallhäuser, K.H.: Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene. 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, 1978), daß die quartären Ammoniumbasen nur dann bakterizid wirksam sind, wenn mindestens einer der Substituenten am Stickstoff aus einer linearen Alkylkette mit 8-18 Kohlenstoffatomen besteht, wobei die optimale Kettenlänge bei C_{12} - C_{16} liegt. Die bekanntesten Vertreter dieser Stoffklasse sind die Benzalkonium-Salze (Chloride und Bromide). Darüber hinaus sind Hexadecylpyridinium-chlorid und Benzethonium-chlorid bekannt und haben medizinische und pharmazeutische Bedeutung erlangt. Die Wirkung dieser Invertseifen ist bekanntlich stark milieuabhängig. Durch Seifen z.B. wird die Wirkung weitgehend aufgehoben, wie auch im sauren pH-Bereich. Auch Blut, Eiter, Stuhl sowie Schmutz führen gleichfalls zur Inaktivierung. Außerdem haben sie eine Eiweiß fällende Wirkung, die schon bei geringen Konzentrationen der N^+ -Tenside einsetzt, d.h. im Bereich von 1-2 Gew.% von wässrigen Lösungen. Bei Konzentration dieser bekannten Tenside, welche nur das 2-3-fache der kritischen KMK betragen, erfolgt zwar keine eiweißfällende Wirkung (Denaturierung), doch eine reversible Inaktivierung von Enzymsystemen und Stützproteinen durch Entfaltung der aktiven dreidimensionalen Struktur. ("loss of activity through unfolding")

Bekannt ist auch die antibakterielle und unspezifische Wirkung von quartären Ammoniumverbindungen und ihre oberflächenaktive Wirkung, von Dequalinium-acetat, Cetyltrimethyl-ammonium-bromid (CTAB) und Hexadecyl-pyridiniumchlorid (CPCl), (siehe z.B. Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics, EDS. A.G. Goodman, L.S. Goodman, Th.W. Rall, F. Murad, 1985, 7th Edition, Collier,

MacMillan Publishing Company, N. Y., S. 971.; Merck Index, 1985). Die micellaren Eigenschaften dieser Verbindungen sind mit ihrer Oberflächenaktivität und antimikrobiellen Eigenschaften in Beziehung gesetzt worden (siehe Attwood, D. and Florence, A.T., Surfactant Systems, Chapman and Hall, London u. New York, 1983). Jedoch kann die unspezifische Oberflächenaktivität dieser quartären aliphatischen und aromatischen Ammoniumbasen nicht a priori als Voraussetzung für die antibakterielle, antifungale und keratolytische Wirkung angesehen werden, da nichtionische Detergentien, z.B. Brij, Triton X 100, Lubrol etc. nicht reaktiv werden.

Organische quartäre Ammoniumbasen des Typs $(R_n, R_1, R_2, R_m, N^+)Y^-$, $(HET=N^+-(CH_2)_x-CH_3)Y^-$ und $[H_3C)_3C-CH_2-C(CH_3)_2-X_1-[O-(CH_2)_2]_z-N^+(CH_3)_2-CH_2-X_2]Y^-$ sind nur zum Teil bekannt, z.B. Hexadecyltrimethylammoniumchlorid und Bromid (Cetyltrimethylammonium-), Hexadecylpyridiniumchlorid bzw. Bromid (Cetylpyridiniumchlorid) und N,N'-Dimethyl-N-2 2-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxyethylphenyl methaniniumchlorid (Benzethoniumchlorid, Methylbenzethoniumchlorid) und die Benzalkoniumchloride mit Alkylresten von C_6H_{17} bis $C_{18}H_{37}$. Diese genannten N^+ -Tenside haben alle eine kleine kritische Micellbildungskonstante (KMK) im Bereiche von 10^{-4} - 10^{-5} Mol, je nach Milieubedingungen, wie z.B. Ionenstärke, Temperatur, Druck und Zusatz von organischen Lösungsmitteln bestimmter Dielektrizitätskonstanten. Der Einfluß eines Anions, Y^- , wie fraktionierte Bindungen, Zahl der Anionen an der Micelloberfläche (Stemlayer) und ihr Einfluß auf die geometrische Form der gesamten kationischen Micelle der oben genannten quartären organischen Ammoniumbasen ist bisher wenig untersucht. So auch die Form dieser o.g. Tenside in Gegenwart von Potenzierungsgemischen, wie Glycerol, Dimethylsulfoxid, Ethanol, Propanol und ihre Stabilität gegenüber Temperatur und Aufnahmefähigkeit von hydrophoben (lipophilen) pharmazeutischen Wirkstoffen. Hier liegen keine quantifizierbare Untersuchungen auch der o.g. N^+ -Tenside vor.

Tenside der allgemeinen Form $(HET=N^+-(CH_2)_x-CH_3)Y^-$, wobei der Heterozyklus ein Benzimidazol-, Pyrimidin-, Imidazol-, Thiazol-, Benz-thiazol oder Purinrest ist sind bislang nicht beschrieben worden, sowie ihr micellares Verhalten in wäßrigen Lösungen in Gegenwart und Abwesenheit von Potenzierungsgemischen. Dies gilt ebenso für substituierte Pyridiniumverbindungen, welche darüber hinaus - wie später gezeigt werden wird - in wäßriger Lösung Vesikel bestimmter Größe und Form bilden können.

Der relativ breite und undifferenzierte Wirkungsmechanismus der bereits bekannten quartären organischen Ammoniumbasen und das damit bedingte Anwendungsgebiet als Antiseptika und ihre toxische Wirkung bei höheren therapeutischen Dosen, hat die Anwendung dieser organischen quartären Ammoniumbasen pharmazeutisch beschränkt. Auch ist für 1 Gew.-%-ige oder höher wäßrige Lösungen, Cremes und Salben hypersensitive, allergische und topische Irritationen beobachtet worden, so daß ein gezielter therapeutischer Einsatz nur bedingt möglich ist.

Bekannt ist die bakterizide Wirkung von Chlorhexidin bei grampositiven und gramnegativen Bakterien, jedoch resistent gegen gramnegative Bazillen.

Pharmazeutische Präparationen, welche eine gezieltere Therapie mit micellar eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoffen, z.B. antiviraler, antifungaler, antineoplastischer Natur in therapeutisch wirksamen Dosen und einer geeigneten pharmazeutischen Zubereitung (Galenik) liegen nicht vor.

Ein großer Nachteil der bisher bekannten pharmazeutischen Zubereitungen von quartären organischen Ammoniumbasen, auch in Gegenwart von Potenzierungsgemischen, liegt in der Polydispersität der kolloidalen micellaren Lösungen. Je nach pharmazeutischer Zubereitungsform, pH-Wert, Ionenstärke, Gegenanion Y^- und Temperatur liegen in einer pharmazeutischen Zubereitung bislang Micellen verschiedener Form und Größe sowie Stabilität und Aufnahmekapazität von pharmazeutischen Wirkstoffen vor.

Im weitesten Sinne versteht man unter Micellen durch Assoziation gebildete Aggregate von gelösten Molekülen. Im engeren, heute hauptsächlich verwendeten Sinn bezeichnet man als Micellen diejenigen Aggregate, die sich aus Tensid-Molekülen in wäßrigen Lösungen oberhalb einer bestimmten Temperatur (Krafft-Punkt) bzw. einer charakteristischen Konzentration bilden. Diese Konzentration nennt man kritische Micellbildungskonzentration (KMK; englisch: critical micellization concentration, cmc). Beim Überschreiten der KMK bleibt die Monomerenkonzentration praktisch konstant und die überschüssigen Tensid-Moleküle bilden Micellen. Diese können in verschiedener Gestalt (Kugeln, Stäbchen, Scheibchen) auftreten, abhängig von der chemischen Konstitution des Tensids sowohl von Temperatur, Konzentration oder Ionenstärke der Lösung. Die Micellen haben charakteristische Aggregationszahlen mit einer meist nur geringen Verteilungsbreite. Das Erreichen der KMK gibt sich durch sprunghafte Änderungen der Oberflächenspannung, (was man zur Messung der KMK ausnützt) des osmotischen Drucks, der elektrischen Leitfähigkeit und Viskosität zu erkennen.

Bei den Micellen handelt es sich um thermodynamische stabile Assoziationskolloide grenzflächenaktiver Stoffe, bei denen die hydrophoben Reste der Monomeren im Inneren der Aggregate liegen und durch hydrophobe Wechselwirkung (van-der-Waals-Kräfte) zusammengehalten werden; die hydrophilen Gruppen sind dem Wasser zugewandt und vermitteln durch Solvation die Löslichkeit des Kolloids.

Weitere Informationen über Micellen finden sich in Römpps Chemielexikon, 8. Auflage, Franckh'sche Verlagsbuchhandlung Stuttgart, 1985, Seite 2600ff.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, eine pharmazeutische Zubereitung zu schaffen, die den Wirkstoff in möglichst stabiler Form enthält und bei welcher der Wirkstoff am Ort des pathologischen Geschehens möglichst schnell und vollständig freigesetzt wird.

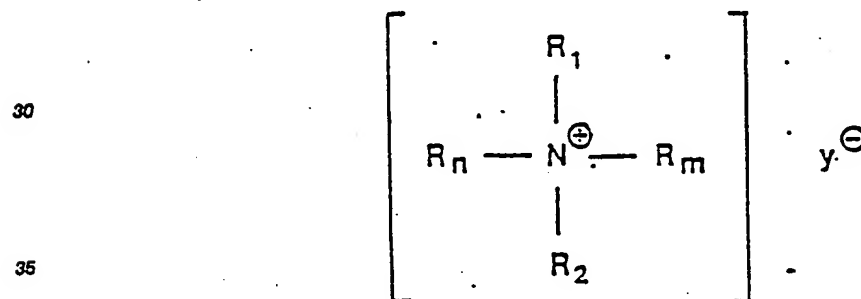
Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine pharmazeutische Zubereitung gelöst, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie aufgebaut ist aus einer Micelle, bestehend aus einem kationischen Tensid mit einem einwertigen Anion und einem hydrophoben pharmazeutischen Wirkstoff, dispergiert in einem Lösungsmittel, dessen pH-Wert kleiner ≤ 7 ist, wobei die kritische Micellbildungskonzentration (KMK) im Bereich von $1,0 \cdot 10^{-7}$ bis $1,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter liegt.

Vorzugsweise ist diese pharmazeutische Zubereitung aufgebaut aus einer Micelle, bestehend aus einem kationischen Tensid mit einem einwertigen Anion in einer Menge von 0,01 bis 0,1 Gew.% bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zubereitung, und einem hydrophoben pharmazeutischen Wirkstoff in einer Menge von 0,001 bis 0,5 Gew.% bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zubereitung, dispergiert in einem Lösungsmittel, dessen pH-Wert $\leq 7,0$ ist, in einer Menge von 99,40 bis 99,989 Gew.% bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zubereitung, wobei die kritische Micellbildungskonzentration (KMK) im Bereich von $1,0 \cdot 10^{-7}$ bis $1,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter liegt.

Diese hier beschriebenen Micellen in wäßriger Phase haben bei einer hydrophoben Kettenlänge von 15-(CH₂)-Gruppen einschließlich ihres quartären Stickstoffs im aromatischen Gebilde einen Durchmesser von -50-100 Å, je nach Natur der Gegenionen.

Beschreibung und Herstellung der quartären Ammoniumbasen:

Das erfindungsgemäße kationische Tensid ist vorzugsweise eine Verbindung der allgemeinen Formel



wobei vorzugsweise

R_1 = ein Alkylrest mit 1 - 12 C-Atomen oder ein Aralkylrest,

R_2 = ein Alkylrest mit 1 - 12 C-Atomen oder ein Aralkylrest,

R_n = ein geradkettiger oder verzweigter Alkylrest, substituiert oder nicht substituiert, mit 1 - 22 C-Atomen, vorzugsweise 10 - 20 C-Atomen oder ein Alkenylrest mit 8 - 20 C-Atomen, vorzugsweise 8 - 10 C-Atomen oder ein 5- oder 6-gliedriger aromatischer Heterozyklus mit einem oder 2 Stickstoffatomen, und wahlweise einem Schwefelatom oder einem Sauerstoffatom und

R_m = ein geradkettiger oder verzweigter Alkylrest, substituiert oder nicht substituiert, mit 1 - 22 C-Atomen, vorzugsweise 10 - 20 C-Atomen oder ein Alkenylrest mit 8 - 20 C-Atomen, vorzugsweise 8 - 10 C-Atomen oder ein 5- oder 6-gliedriger aromatischer Heterozyklus mit einem oder 2 Stickstoffatomen, und wahlweise einem Schwefelatom oder einem Sauerstoffatom oder ein Chinoliniumrest und

y^- = ein einwertiges Anion ist.

Weitere Vorzugsweise Ausführungsformen sind:

Geradkettiges oder verzweigtes Alkyl R_n mit C₆-C₂₂, insbesondere aber C₁₂-C₂₀, Kohlenstoffatom, ist beispielsweise n-Heptyl, 2-Methylhexyl-, 3-Methylhexyl-, 3-Ethylpentyl-, 2,2-, 2,3-, 2,4-, oder 3,3-Dimethylpentyl-, n-Octyl-, 4-Methylheptyl-, 2,2,2-, 2,2,4-, 2,3,3-, 2,3,4-Trimethylpentyl-, n-Nonyl-, n-Decyl-, n-Undecyl-, n-Dodecyl-, n-Tridecyl-, n-Tetradecyl-, n-Pentadecyl-, n-Hexadecyl (Cetyl), n-Heptadecyl-, n-Octadecyl-, n-Nonadecyl oder n-Eicosyl (Arachinyl).

Bevorzugt wird ein geradkettiges Alkyl mit einer geraden Anzahl von 10-20 Kohlenstoffatomen, z.B. n-Dodecyl, n-Tetradecyl, n-Hexadecyl (Cetyl), n-Octadecyl oder n-Eicosyl. Sie haben alle die gleiche Bindungs- und Aufnahmekapazität von anorganischen und organischen (hydrophoben) Wirkstoffen, beispielsweise $\text{Hg}(\text{CN})_2$, ZnEDTA, ZnO, und $\text{K}_{18}(\text{KW}_{21}\text{Sb}_9\text{O}_{48})_{17}$ als anorganische antivirale Wirkstoffe, und Azathioprin, Nystatin, Amphotericin, Idoxuridin, Cytarabin und Trifluorthymidin als organische Wirkstoffe.

Bevorzugt ist ein Alkenyl mit 12-20 Kohlenstoffatomen für R_n , wenn R_m ein Methyl-, Ethyl bis zum Hexyl-Rest ist, speziell ein Alkenyl mit einer Doppelbindung, z.B. 9-cis-Dodecenyl, 9-cis-Tetradecenyl, 9-cis-Hexadecenyl, 6-cis-Octadecenyl, 6-trans-Octadecenyl und 9-cis-Octadecenyl.

R_1 , R_2 und R_m ist vorzugsweise Methyl-, Ethyl oder auch Hexyl.

Ein aromatischer Heterozyklus für R_n der Formel (I) ist ein 5- oder 6-gliedriger Heterozyklus, mit einem oder zwei Stickstoffatomen und wahlweise einem Stickstoff- und einem Schwefelatom z.B. ein Pyridin-, ein Pyrimidin-, ein Pyrazin-(1,4-Diazin), ein Pyrazol-, ein Imidazol-, ein Thiazol- und Purinrest (7N-Imidazolium-[4,5-d]pyrimidin) oder ein benzokondensierter Thiazol- und Imidazolrest z.B. N_3 -Benzimidazol oder Benzthiazol.

Substituenten dieses Heterozyklus sind am Stickstoffatom sowie gegebenenfalls an einem Kohlenstoffatom ein Niederalkyl, z.B. Methyl oder Äthyl, oder ein Hydroxyniederalkyl, z.B. Hydroxymethyl oder 2-Hydroxyäthyl, Oxo, Hydroxy oder Halogen, z.B. Chlor oder Brom.

Ein Heterocyclus ist vorzugsweise 2- oder 4-Niederalkylpyridinium z.B. 2- oder 4-Methyl oder 2- oder 4-Äthylpyridinium, Diniederalkylpyridinium z.B. 2,6-Dimethyl-, 2-Methyl-3-äthyl-, 2-Methyl-4-äthyl-, 2-Methyl-5-äthyl- oder 2-Methyl-6-äthylpyridinium, 2-, 3- oder 4-Halogenpyridinium z.B. 2-, 3- oder 4-Chlorpyridinium oder 2-, 3- oder 4-Brompyridinium, 2-Niederalkylimidazolium, -oxazolinium oder -thiazolinium z.B. 2-Methyl- oder 2-Äthylimidazolium, -oxazolinium oder -thiazolinium oder 2-Niederalkyl-8-halogenchinolinium z.B. 2-Methyl-8-chlorchinolinium.

Y_e ist ein Anion, vorzugsweise Chlorid, Bromid, Jodid oder Ethylsulfat, ein Niederalkonat, wie Formiat, Acetat, Propionat, Hydrogensulfat (HSO_4^-), Malat oder Fumarat, Salizylat, Alginat oder Glukonat.

Ein kationisches Tensid der allgemeinen Formel (I) ist vorzugsweise N-Benzyl-N,N-dimethyl-N-2-[2-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenoxy)-äthoxy]-äthylammoniumchlorid, N-Benzyl-N,N-dimethyl-N-2-[2-(3-methyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenoxy)-äthoxy]-äthylammoniumchlorid (Methylbenzethoniumchlorid), n-Dodecyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid, Trimethyl-n-tetradecylammoniumchlorid oder -bromid, n-Hexadecyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid (Cetyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid), Trimethyl-n-octadecylammoniumchlorid oder -bromid, Äthyl-n-dodecyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid, Äthyltrimethyl-n-tetradecylammoniumchlorid oder -bromid, Äthyl-n-hexadecyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid, Äthyltrimethyl-n-octadecylammoniumchlorid oder -bromid, n-Alkyl-benzyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid (Benzalkoniumchlorid oder -bromid), z.B. Benzylndodecyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid, Benzyltrimethyl-n-tetradecylammoniumchlorid oder -bromid, Benzyl-n-hexadecyltrimethylammoniumchlorid oder -bromid oder Benzyltrimethyl-n-octadecylammoniumchlorid oder -bromid, N-(n-Decyl)-pyridiniumchlorid oder -bromid, N-(n-Dodecyl)-Pyridiniumchlorid oder -bromid, N-(n-Tetradecyl)-pyridiniumchlorid oder -bromid, N-(n-Hexadecyl)-pyridiniumchlorid oder -bromid (Cetylpyridiniumchlorid) oder N-(n-Octadecyl)-pyridiniumchlorid oder -bromid oder eine Mischung von diesen Tensiden.

Ein kationisches Tensid der allgemeinen Formel (I) $R_n\text{N}^+(R_1, R_2)R_mY_e$ ist vorzugsweise mit $R_n = R_1 = R_2$ z.B. $R_n\text{N}^+(\text{CH}_3)_3Y_e$ 3-Methyl-Hexyl-trimethyl-Ammoniumchlorid, n-Nonyl-Trimethyl-Ammoniumbromid, n-Undecyl-trimethyl-Ammoniumchlorid, n-Hexadecyl-trimethyl-Ammoniumchlorid, n-Octadecyl oder n-Eicosyl-trimethyl-Ammoniumbromid mit einer geraden Anzahl von 12-20 Kohlenstoffatomen.

Auf der Grundlage einer Mikro-Emulsion und/oder Salbe z.B. in Gegenwart bis zu 10 % (g/g) DMSO haben diese N-Tenside gleiche antifungale, antibakterielle und keratolytische Eigenschaften wie die nicht kovalent gebundenen pharmazeutischen Wirkstoffe.

Die Herstellung der Tenside der allgemeinen Formel $R_n\text{N}^+(R_1, R_2)R_mY_e$ sind analog dem in dem Standardwerk "Cationic Surfactants" von E. Jungermann, Dekker, N.Y., 1970 beschrieben, herzustellen, siehe auch das jährlich neu erscheinende Handbuch "Mc Cutcheon's Emulcifiers and Detergents" Manufacturing Cofectioner Publishing Co.. Andere Alkyl-Pyridinium Halogenide können durch Reaktion von stöchiometrischen Mengen des Pyridinderivates mit langkettigen Alkylhalogeniden in guter Ausbeute erhalten werden. Andere Verfahren gehen von den entsprechenden, ultra-zyklischen N-Verbindungen und 1,3-Propanmethan aus, wie z.B. bei F.J. Fendler et al, J.Chem.Soc., Perkin Trans III., 1097 (1977) beschrieben. Andere Verfahren, welche zu ähnlich guter Ausbeute führen, sind z.B. bei Attwood, D., Elwarthy, P.H., and Kaye, S.B., J.Phys.Chem. 74, 3529 (1970) beschrieben, sie können analog für die Synthese der Substanzen der Formel II angewendet werden. Die pharmazeutischen Wirkstoffe sind im Handel erhältlich.

Die Synthese der Verbindungen der allgemeinen Formel $R_n, R_m, R_1, R_2\text{N}^+Y_e$ oder $R_n, R_m\text{N}^+(\text{CH}_3)_3Y_e$ im speziellen werden nach folgender Vorschrift dargestellt:

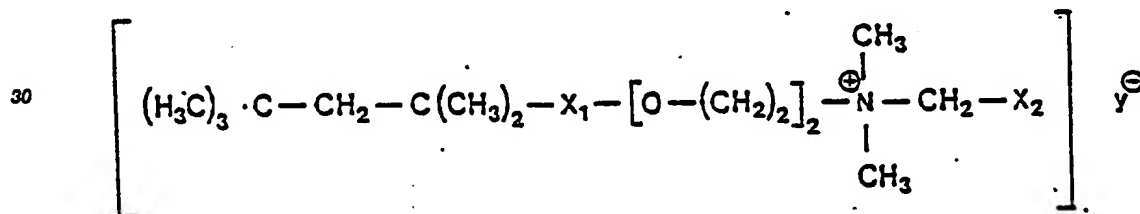
a) Das entsprechende Alkyljodid oder Bromid wird mit einem Überschuß von Trimethylamin (Halogenid: Amin = 1:1,45) für 24 Stunden bei 20°C zur Herstellung der entsprechenden quartären Ammoniumbase im Autoklaven stehen gelassen. Kein anderes Lösungsmittel als Methanol, welches mit dem Trimethylamin oder R₁, R₂-Alkylamin gesättigt worden ist, wurde verwendet. Das Reaktionsgemisch wird in ein 5-faches Volumen von Ether eingerührt und am Rückfluß für 20 min erhitzt. Der feste Rückstand, der sich nach Abkühlung in Ether bildet, wird abfiltriert. Umkristallisiert wird aus Chloroform. Die Kristalle werden wiederholte male mit wasserfreiem Ether gewaschen. Die Rekristallisationen bis zum konstanten Schmelzpunkt wurden aus Ethanol/Ether (1:1, % g/g) in Gegenwart von aktivierter Holzkohle vorgenommen. Die Kristalle wurden bei 80 °C über Kalziumchlorid unter Vakuum bei 1 mm/Hg über Nacht getrocknet.

b) Zur Herstellung von R_n, R_m, R₁, R₂-N⁺Ye werden die entsprechenden Amine R₁, R₂-N⁺-Amine mit den stöchiometrischen Mengen der R_n, R_m-Jodide in absolutem Ethanol-Hexan(1:2 % g/g) für 48 Stunden am Rückfluß gekocht. Danach wird die Reaktion abgekühlt und in einen 5-fachen Überschuß von Ether gegossen und abfiltriert. Die Rekristallisation erfolgte wie unter a) angegeben.

c) Um die quartären Ammoniumhalogenide in die entsprechenden Bromide, Chloride oder auch Jodide umzuwandeln, bietet sich folgendes Verfahren an:

300 g Amberlite IRA-400 (4 mequiv/g) als Chloridform vorliegend, werden in einer Säule (45×5 cm) gefüllt und mit 1 Liter einer 20%igen wässrigen Lösung Kaliumchlorid oder Kaliumbromid oder Kaliumjodid oder KYe bei sehr langsamer Durchflußzeit gewaschen. Die Matrix wurde danach mit deionisiertem Wasser gewaschen bis keine Reaktion auf Chlorid oder Bromid oder Jodid mehr eintrat. Anschließend wurde die Säulenmatrix mit einer 10%igen wässrigen Lösung eines quartären Ammoniumbromides beladen. Die nachfolgende Elution erfolgte mit Wasser bei einer Flußrate von 1 ml/min. Das entsprechende quartäre Ammoniumbromid bzw. -halogenid wurde durch Konzentrieren des Eluates am Rotationsverdampfer erhalten. Die Rekristallisation erfolgte wie unter a) beschrieben. Die nachfolgende Tabelle 4 zeigt einige kationische Tenside der Form R_n N⁺(CH₃)₃ Ye, welche nach diesem Verfahren hergestellt worden sind.

Eine Unterklasse der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) ist die Verbindung der allgemeinen Formel



Es handelt sich um Abkömmlinge der Benzethoniumhalogenide. Durch Substitution der Reste X₁ und X₂ wobei X₁=X₂ sein kann, können analog hergestellt werden wie sie bereits im US-Patent 2,115,250 von (1938) oder auch nach US-Patent 2,170,111 von (1939) und 2,229,024 von (1941) beschrieben sind. Diese speziellen N-Tenside sind besonders stabil auch in Gegenwart eines Potenzierungsgemisches und haben überraschenderweise eine hohe Aufnahmekapazität zum micellaren Einschluß von pharmazeutischen Wirkstoffen. Außerdem sind sie bei verfahrensgemäßer Herstellung milieuunabhängig. Ye ist ein Anion z.B. Chlorid, Bromid und auch Jodid, ein Niederalconat, wie Formiat, Acetat, Propionat, Malat oder Fumarat, Salizylat, Alginat oder Glukonat.

5

Tabelle 4:

Preparation und Schmelzpunkt, sowie Elementaranalyse der quartären Ammonium-
Verbindungen des Typus $RN^+(CH_3)_3 Y^-$ aus $R_n, R_m, R_l, R_2 N^+ Y^-$ mit $R_l = R_2$ und $R_n = R_m$.

| 10 | Nr. | R | Y^- | K:K Mol | Fp. °C | Analyse gefunden | | | |
|----|-----|---------------|-------|----------------------|-------------------|------------------|------|------|-------|
| | | | | | | C | H | N | Y |
| | 1 | Methyl | Br | $1,5 \times 10^{-5}$ | | | | | |
| | 2 | Ethyl | I | $2,0 \times 10^{-5}$ | >300 ^c | 27,90 | 6,56 | 6,49 | |
| 15 | | | | | >300 ^d | 27,92 | 6,56 | 6,51 | |
| | 3 | n-Propyl | I | $2,0 \times 10^{-5}$ | 190 | 31,51 | 7,05 | 6,09 | |
| | | | | | 189 | 31,46 | 7,04 | 6,11 | |
| 20 | 4 | Isopropyl | I | $3,5 \times 10^{-5}$ | >300 | 31,50 | 7,08 | 6,09 | |
| | | | | | 316 | 31,46 | 7,04 | 6,11 | |
| | 5 | n-Butyl | I | $4,1 \times 10^{-5}$ | 231 | 34,69 | 7,48 | 5,72 | |
| 25 | | | | | 226 | 34,58 | 7,46 | 5,76 | |
| | 6 | t-Butyl | I | $6,0 \times 10^{-6}$ | 256 | 34,66 | 7,47 | 5,72 | |
| | | | | | 260 | 34,58 | 7,46 | 5,76 | |
| 30 | 7 | n-Pentyl | I | $7,0 \times 10^{-5}$ | 224 | 37,28 | 7,86 | 5,41 | |
| | | | | | | 37,37 | 7,84 | 5,45 | |
| | 8 | 1-Methylbutyl | I | $1,0 \times 10^{-6}$ | 224 | 37,48 | 7,87 | 5,43 | 49,17 |
| 35 | | | | | | 37,37 | 7,84 | 5,45 | 49,34 |
| | 9 | n-Hexyl | I | $7,9 \times 10^{-6}$ | 160 | 39,68 | 8,19 | 5,11 | |
| | | | | | 166 | 39,86 | 8,18 | 5,16 | |
| 40 | 10 | Cyclopentyl | I | $6,0 \times 10^{-6}$ | 271 | 37,78 | 7,13 | 5,41 | 49,63 |
| | | | | | | 37,66 | 7,11 | 5,47 | 49,74 |
| | 11 | Cyclohexyl | I | $7,1 \times 10^{-6}$ | 271 | 40,25 | 7,48 | 5,18 | |
| 45 | | | | | | 40,16 | 7,49 | 5,20 | |
| | 12 | Allyl | I | $1,5 \times 10^{-7}$ | 104 | 31,81 | 6,22 | 6,15 | 55,76 |
| | | | | | 102 | 31,73 | 6,21 | 6,17 | 55,89 |
| 50 | 13 | 2-Propynyl | I | $6,0 \times 10^{-5}$ | 181 | 32,09 | 5,40 | 6,19 | 56,29 |
| | | | | | | 32,01 | 5,37 | 6,22 | 56,39 |
| | 14 | 3-Butenyl | I | $3,5 \times 10^{-5}$ | 236 | 34,93 | 6,70 | 5,78 | 52,56 |
| 55 | | | | | | 34,87 | 6,69 | 5,81 | 52,63 |

| Nr. | R | γ^9 | K _K Mol | Fp. °C | Analyse gefunden | | | |
|-----|----|----------------|-----------------------|----------------------|------------------|-------|------|------|
| | | | | | C | H | N | Y |
| 5 | 15 | Phenyl | I | 7,0x10 ⁻⁵ | 227 | 41,12 | 5,38 | 5,31 |
| | | | | | 227 | 41,08 | 5,36 | 5,32 |
| 10 | 16 | Benzyl | I | 7,3x10 ⁻⁵ | 179 | 43,33 | 5,82 | 5,00 |
| | | | | | 179 | 43,33 | 5,82 | 5,05 |
| 15 | 17 | 4-Chlorbutyl | I | 5,1x10 ⁻⁶ | 182 | 29,42 | 5,97 | 5,01 |
| | | | | | | 30,28 | 6,17 | 5,05 |
| 20 | 18 | 4-Brombutyl | I | 7,0x10 ⁻⁶ | 131 | 25,30 | 5,40 | 4,62 |
| | | | | | | 26,10 | 5,32 | 4,35 |
| 25 | 19 | 4-Jodbutyl | I | 1,5x10 ⁻⁷ | 160 | 23,43 | 4,75 | 4,00 |
| | | | | | | 22,78 | 4,64 | 3,79 |
| 30 | 20 | 2-Ethoxyethyl | Br | 2,0x10 ⁻⁷ | 174 | 39,07 | 8,44 | 6,49 |
| | | | | | | 39,63 | 8,55 | 6,60 |
| 35 | 21 | 2-Phenoxyethyl | Br | 1,5x10 ⁻⁷ | 162 | 50,74 | 6,98 | 5,34 |
| | | | | | | 50,78 | 6,97 | 5,38 |
| 40 | 22 | p-Methylbenzyl | Br | 2,0x10 ⁻⁷ | 197 | 53,97 | 7,78 | 5,66 |
| | | | | | | 54,10 | 7,43 | 5,74 |
| 45 | 23 | p-Fluorbenzyl | Br | 2,5x10 ⁻⁷ | 237 | 48,32 | 6,10 | 5,61 |
| | | | | | | 48,40 | 6,09 | 5,65 |
| 50 | 24 | p-Chlorbenzyl | Br | 3,0x10 ⁻⁵ | 207 | 45,39 | 5,71 | 5,29 |
| | | | | | | 45,39 | 5,75 | 5,26 |
| 55 | 25 | p-Brombenzyl | Br | 4,0x10 ⁻⁵ | 220 | 38,93 | 4,92 | 4,52 |
| | | | | | | 38,86 | 4,89 | 4,53 |

Das erfindungsgemäße kationische Tensid ist vorzugsweise eine Verbindung der allgemeinen Formel
 [HET = N⁺-(CH₂)_x-CH₃] y⁻

45 wobei

HET=N⁺-ein substituierter oder nichtsubstituierter Pyridiniumrest oder
 ein substituierter oder nicht substituierter Pyrimidiniumrest oder
 ein substituierter Pyrazin-(1,4-Diazinium)rest oder
 ein Imidazoliumrest (4,5-d)pyrimidin Rest substituiert oder nicht substituiert, oder
 50 ein substituierter oder nicht substituierter Imidazolium-Rest oder
 ein substituierter oder nicht substituierter Pyrazoliumrest, oder
 ein substituierter oder nicht substituierter Thiazoliumrest, oder
 ein substituierter oder nicht substituierter Benz-thiazoliumrest, oder
 ein substituierter oder nicht substituierter Benz-imidazoliumrest,

55 x = 8 bis 20 und

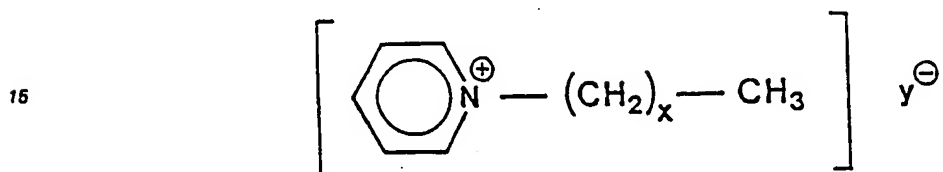
y⁻ = Chlorid, Bromid, Jodid, Formiat, Acetat, Propionat, Hydrogensulfat, Malat, Fumarat, Salicylat, Alginat,
 Glukonat oder Ethylsulfat
 bedeuten.

Vorzugsweise Ausführungsformen dieses kationischen Tensids sind folgende Verbindungen:
 In den folgenden Ausführungsformen, in denen y^- vorkommt, bedeutet dieses y^- jeweils eines der
 vorstehenden dreizehn Anionen.

5

N-Alkyl-pyridinium der Formel

10

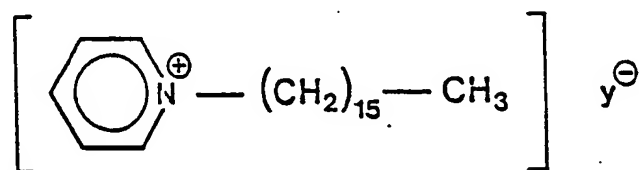


15

20

Hexadecylpyridinium der Formel

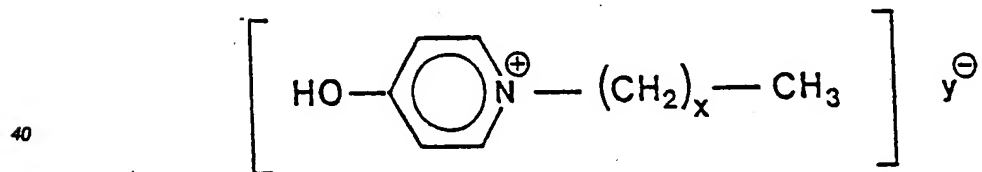
25



30

N-Alkyl-4-hydroxypyridinium der Formel

35

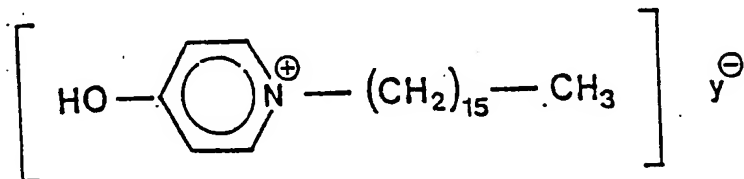


40

45

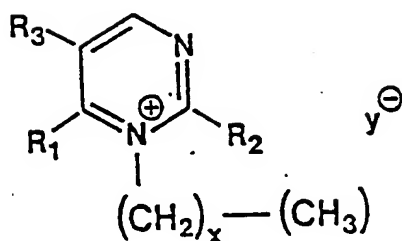
Hexadecyl-4-hydroxypyridinium der Formel

50



55

2,5,6 substituierte N_1 -Alkyl-pyrimidinium-Verbindungen
der Formel



$$R_1 = R_2 = R_3 = H$$

$$R_1 = NH_2; R_2 = OH; R_3 = H$$

$$R_1 = NH_2; R_2 = OH; R_3 =$$

$$R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = CH_3$$

$$R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = H$$

$$R_1 = F; R_2 = OH; R_3 = H$$

$$R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = F$$

2,5,6 substituiertes N_1 -Hexadecylpyrimidinium der Formel

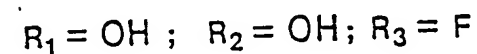
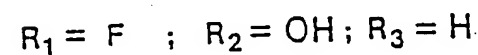
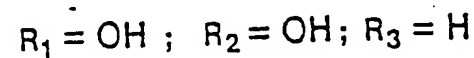
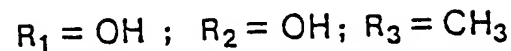
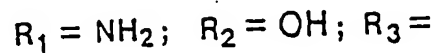
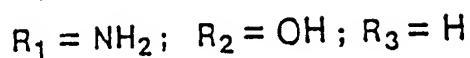
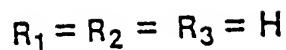
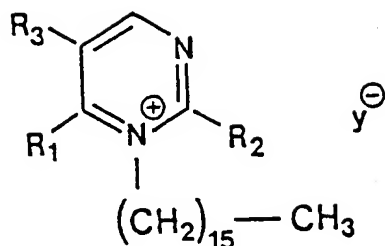
5

10

15

20

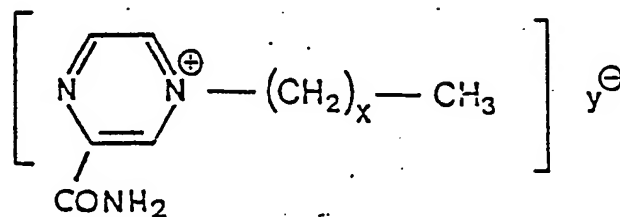
25



4-n-Alkyl-pyrazinium-2-carboxamid der Formel

30

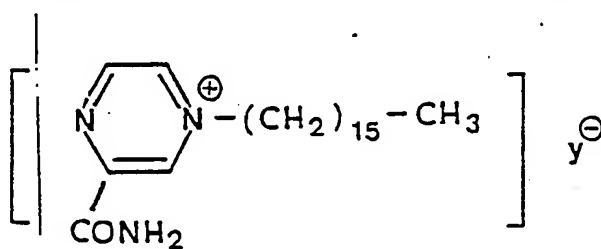
35



4-Hexadecylpyrazinium-2-carboxamid der Formel

40

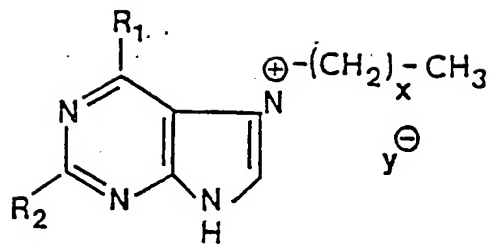
45



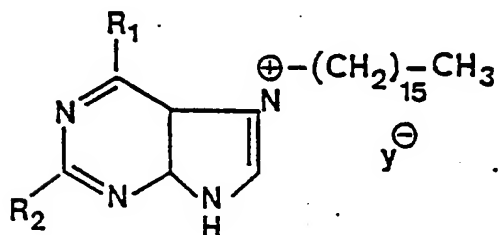
50

7-n-Alkyl-imidazolium [4,5-d]-pyrimidin der Formel

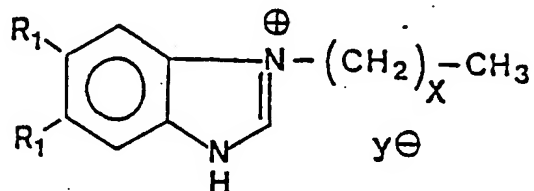
55


 $R_1 = OH ; R_2 = OH$
 $R_1 = H ; R_2 = H$
 $R_1 = F ; R_2 = NH_2$
 $R_1 = F ; R_2 = OH$
 $R_1 = NH_2 ; R_2 = H$
 $R_1 = NH_2 ; R_2 = NH_2$

7-Hexadecylimidazolium [4,5-d]pyrimidin der Formel

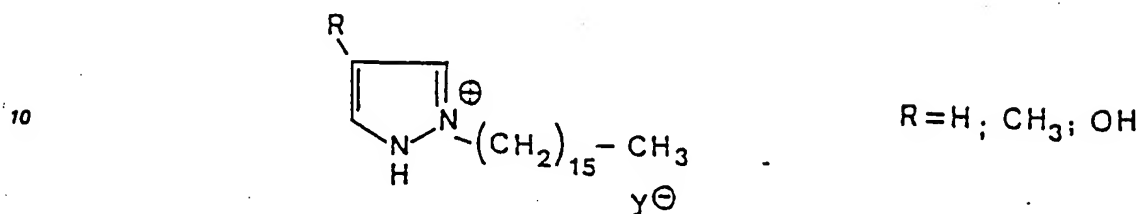

 $R_1 = OH ; R_2 = OH$
 $R_1 = H ; R_2 = H$
 $R_1 = F ; R_2 = NH_2$
 $R_1 = F ; R_2 = OH$
 $R_1 = NH_2 ; R_2 = H$
 $R_1 = NH_2 ; R_2 = NH_2$

3-n-Alkyl-5,6-substituierte Benzimidazolium-Verbindungen der Formel


 $R_1 = OH$

4-substituierte 2-Hexadecylpyrazolium-Verbindungen der Formel

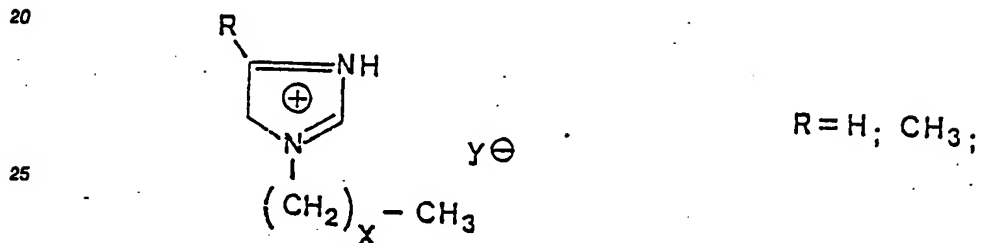
5



15

1-n-Alkyl-4-substituierte Imidazolium-Verbindungen

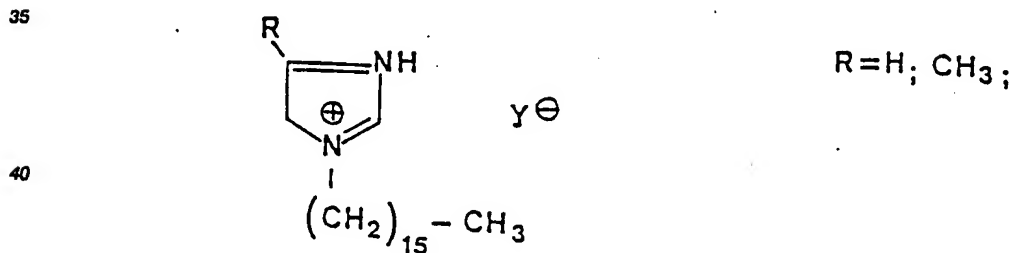
20



30

1-Hexadecyl-4-substituierte Imidazolium-Verbindungen der Formel

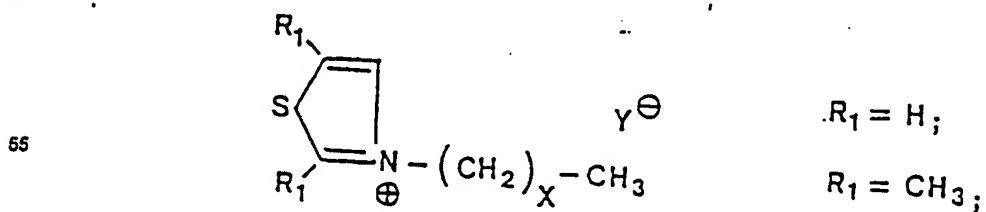
35



45

3-n-Alkyl-5,6-substituierte Thiazolium-Verbindungen der Formel

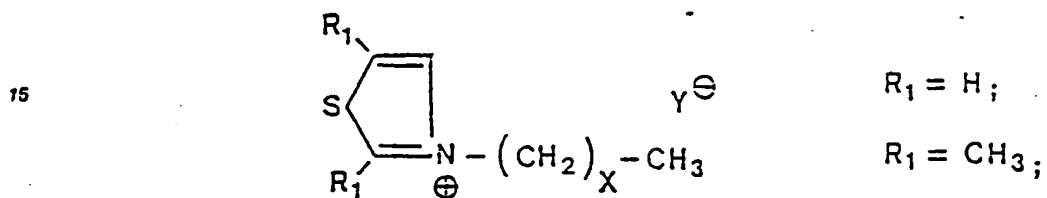
50



5

3-n-Hexadecyl-5,6-substituierte Thiazolium-Verbindungen der Formel

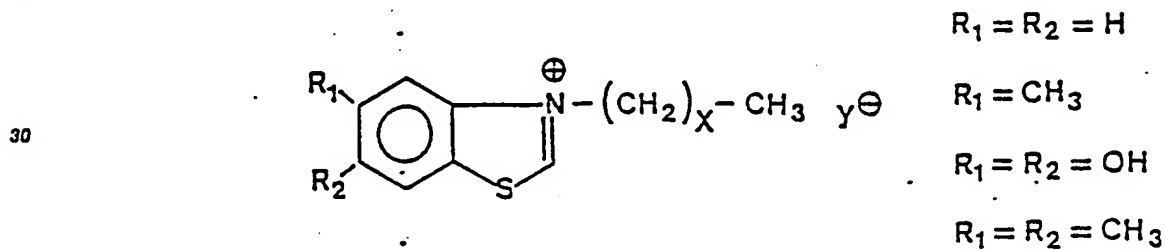
10



20

3-n-Alkyl-5,6-substituierte Benzthiazolium-Verbindungen der Formel

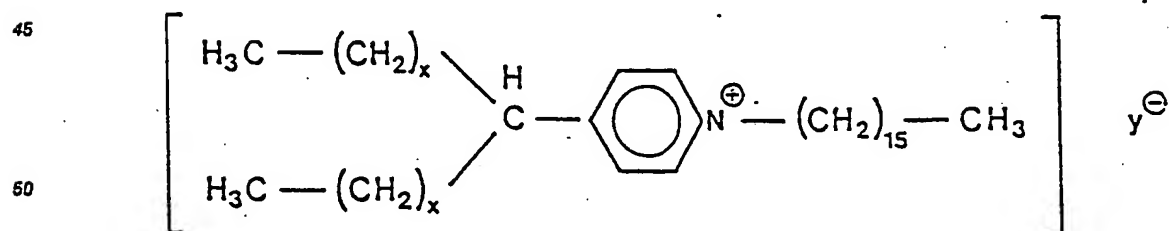
25



35

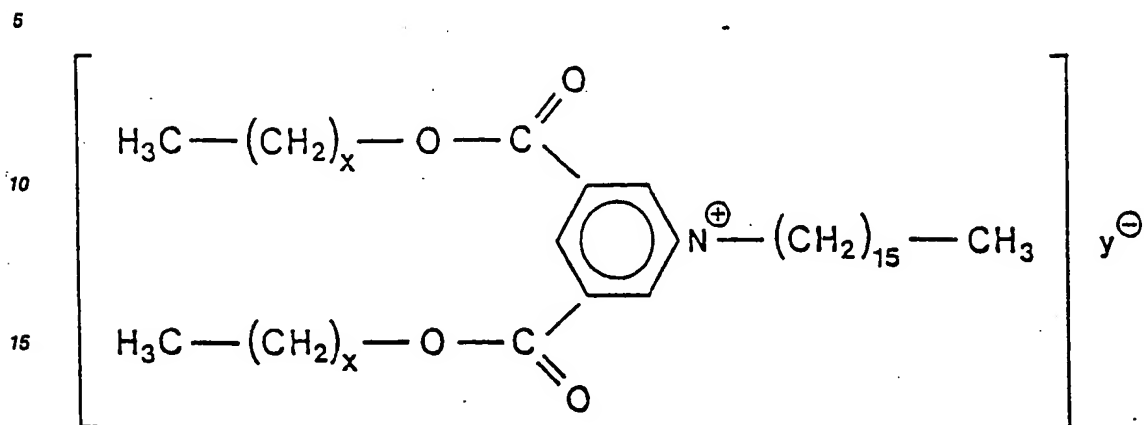
4-[1,1bis n-Alkyl-(Niederalkyl)] N-Hexadecylpyridinium-Verbindungen der Formel

40

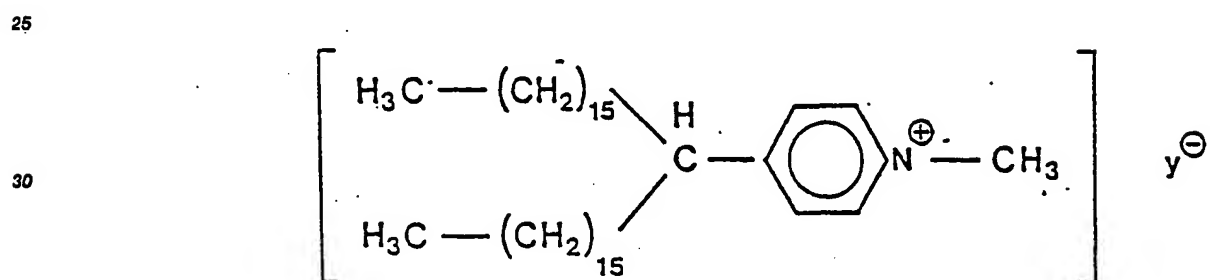


55

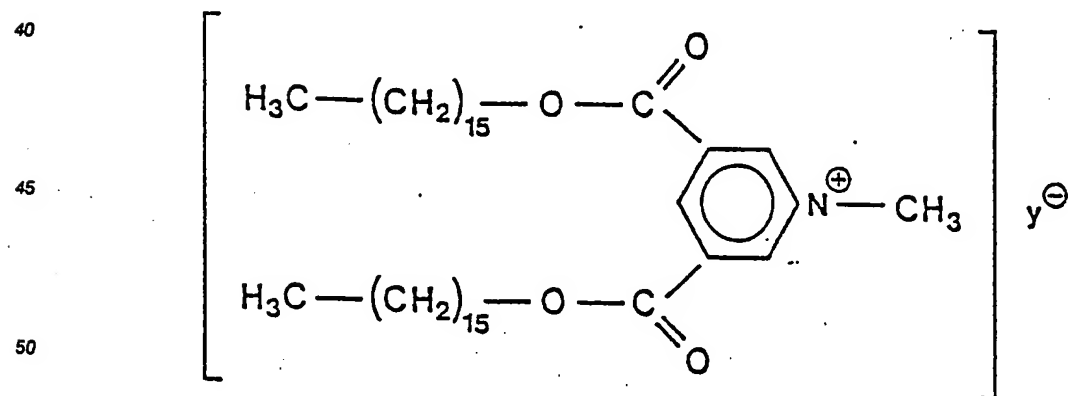
3,5 bis [(n-Alkyloxy)carbonyl]-N-Hexadecylpyridinium-Verbindungen
der Formel



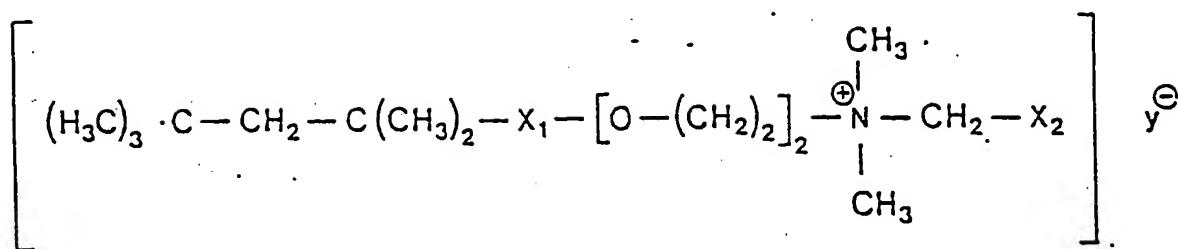
4-(17-tritriacontyl)-n-methyl-pyridiniumchlorid der Formel



3,5bis[(n-hexadecyloxy)carbonyl)]-N-methyl-pyridinium-
chlorid



Kationische Tenside der allgemeinen Formel



10 wobei

x_1 = ein nichtsubstituierter oder in der 4-Stellung oder in der 3,5-Stellung oder in der 1,2,4,5-Stellung substituierter Phenylrest,

x_2 = ein nichtsubstituierter oder in der 4-Stellung oder in der 3,5-Stellung oder in der 1,2,4,5-Stellung substituierter Phenylrest und

15 y = die Anionen gemäß dem Patentanspruch 78 bedeuten.

20 Generelles zur Herstellung der $(HET=N^+-(CH_2)_x-CH_3) Y^-$ -Verbindungen II:

Die erfindungsgemäßen kationischen Tenside der allgemeinen Formel II, außer Hexadecylpyridinium-halogenid, sind neu.

In dem kationischen Tensid der allgemeinen Formel II ist $HET = N^+$ vorzugsweise ein substituierter oder nichtsubstituierter Pyridiniumrest oder ein substituierter oder nicht substituierter Pyridiniumrest oder ein 25 substituierter Pyrazin-(1,4-Diazinium)rest oder ein Imidazoliumrest (4,5-d)pyrimidin Rest substituiert oder nicht substituiert, oder ein substituierter oder nicht substituierter Imidazolium-Rest oder ein substituierter oder nicht substituierter Pyrazoliumrest, oder ein substituierter oder nicht substituierter Thiazoliumrest oder ein substituierter oder nicht substituierter Benz-thiazoliumrest, oder ein substituierter oder nicht substituierter Benz-imidazoliumrest.

30 Diese kationischen Tenside sind dadurch charakterisiert, daß sie eine sehr kleine Micellbildungskonstante (KMK) von ungefähr $1,5 \times 10^{-7}$ Mol haben, sehr stark antimikrobiell, antifungal wirksam sind, keine Polydispersität in Gegenwart von anorganischen Anionen bzw. Potenzierungsgemischen zeigen, und z.T. selbst mikrobielle Stoffwechselprodukte (Antimetabolite) sind, die nicht toxisch für die Wirtszelle sind.

Die Ausbildung der salzartigen Struktur dieser Klasse von kationischen Tensiden der Form $(HET=N^+-(CH_2)_x-CH_3) Y^{\ominus}$ ist u.a. in der Elektronendichte-Verteilung der heteroaromatischen Kerne bzw. in ihrer Basizität, einschließlich des Einflusses der Substituenten, begründet. Eine notwendige Bedingung, welche zur Ausbildung von quartären Salzen dieser fünf- und sechsgliedrigen heteroaromatischen Klasse führt, besteht darin, daß die Elektronendichte am Stickstoff, welcher quartärmiert wird, nach MO-SCF-Rechnungen einen Betrag von -0,08 (z.B. Pyrazin- N_4) bis -0,159 (z.B. Imidazol- N_1 , Purin- N_7) haben muß. Die Stabilität der 40 einzelnen hier beschriebenen heterozyklischen kationischen Tenside wird außerdem noch durch ihre Symmetrie und Kettenlänge der Alkylkette am quartären Stickstoff bestimmt:

Im Falle des Imidazols, Benzimidazols z.B. wird durch die Ausbildung des Salzes am quartären Stickstoff N_1 und das freie Elektronenpaar am N_3 und der dadurch bedingten hohen Symmetrie stabilisiert. Ähnliches gilt für das H_9 -Tautomere des Purins und seiner symmetrisch angeordneten Substituenten, 45 welche die negativen Ladungen am N_1 (-0,124), N_3 (-0,108) und N_9 (-0,149) dergestalt beeinflussen, daß die Quartärnisierung am N_9 bevorzugt wird, indem sich die o.g. Reihe $N_1 \rightarrow N_3 \rightarrow N_9$ umkehrt. Durch die Wahl von geeigneten Lösungsmitteln kann man die Ausbeuten erhöhen. Während für Pyridin-, Pyrimidin- und Imidazolreste symmetrische Effekte am Kern eine wesentliche Rolle spielen, ist z.B. bei Pyrazin der elektronische Effekt in der 2-Stellung bedeutend, jedoch gibt es auch sehr starke induktive Effekte (z.B. 2-Amino-Gruppe), 50 weniger als Mesomere. Dies gilt auch für das Pyrazol.

Die Länge der Alkylkette am quartären Stickstoffatom bestimmt nicht nur Schmelzpunkt und Hydrophobizität der später in wässrigen Lösungen gebildeten kationischen Micellen, sondern auch die Ausbeuten nehmen mit zunehmender Kettenlänge ab, während die Reaktionszeiten z.B. in Nitrobenzol oder 2-Ethoxyethanol zunehmen.

55 Stabile und leicht kristallisierbare Verbindungen werden für C_{12} - C_{18} erhalten, wobei das Gegenion Y^{\ominus} ausnahmslos Bromid und Chlorid ist. Die anderen Verbindungen können leicht aus Aceton oder Chloroform umkristallisiert werden. Die entsprechenden Jodverbindungen sind temperatur- und lichtempfindlich.

Spezielle Herstellung der (HET=N_e-(CH₂)_x-CH₃) Ye-Verbindungen.

a) Die entsprechenden Verbindungen des Pyridins oder substituierten Pyridins als sechsgliedriger Heterozyklus lassen sich aus der entsprechenden Alkylbromiden oder Jodiden in Methanol bei 35 °C und Pyridin bzw. substituierten Pyridinen mit einer Ausbeute von 70 % herstellen. Die entsprechenden molaren Mengen des Alkylbromides, die fast alle im Handel erhältlich sind, aber durch Hochdruckflüssigkeitsschromatographie (HPLC) präparativ nachgereinigt werden müssen, werden zunächst in Methanol (10facher Volumenüberschuss gemessen am Pyridin) gelöst, und unter Stickstoff die stöchiometrische Menge Pyridin, das ebenfalls in Methanol gelöst ist, unter Rühren zugetropft. Es wird über 8 Stunden unter Rühren am Rückfluß bei 70°C erhitzt, so daß die Reaktionsausbeute fast quantitativ ist. So ist z.B. die Ausbeute von Hexadecyl-4-hydroxy-pyridiniumchlorid oder Bromid in Methanol als Lösungsmittel 95 %, mit Ethanol 80 % und in Ether/Ethanol nur 40 %. Dodecylpyridinium-chlorid wird mit einer Ausbeute von fast 70 % erhalten. 3,5-Dihydroxy-dodecylpyridinium-bromid bildet sich quantitativ nach der vorhergehenden Vorschrift aus Dodecyl-bromid und 3,5-Dihydroxypyridin in siedendem Chloroform nach 4 Stunden (Schmelzpunkt 180°C).

Reinigung der entsprechenden Pyridiniumverbindungen. -Durch wiederholtes Umkristallisieren aus Gemischen von Methanol/Ether, beginnend mit 4/60 (v/v); 5/50 (v/v) und schließlich 5/10 (v/v) erhält man die gewünschten Produkte mit konstantem Schmelzpunkt, einheitlich Molekulargewicht und spezifischer oberflächenaktiven Eigenschaften (gemessen durch die Konzentrationsabhängigkeit der Oberflächenspannung). Außerdem zeigen diese Verbindungen die vorne geschilderten typischen ¹H-NMR-Signale. Die zahlreichen CH₂-Gruppen und die CH₃-Gruppe erzeugen eine deutlich sichtbare Absorptionsschwingung im IR-Spektrum bei 2930 cm⁻¹ und 2850 cm⁻¹ (Methylengruppe) eine mittelschwache Bande bei 2960 cm⁻¹ und eine schwache bei 2870 cm⁻¹, welche der Methylgruppe zugeordnet werden kann. Eine schnelle und quantitative Trennung der n-Alkyl-pyridiniumhalogenide von nicht umgesetzten n-Alkylbromiden und Pyridin wird durch präparative Hochdruckflüssigkeitsschromatographie auf einer RP18-Säule mit Hilfe des Elutionsgemisches bestehend aus 60 % (v/v) Methanol (Ethanol) und Acetonitril 40% (v/v) isokratische bei 9,52 atm Säulendruck erreicht (UV-Detektion bei 260 nm).

b) Pyrimidin-Verbindungen

1.) Hexadecylpyrimidinium -bromid.-0,01 Mol 5-Aminopyrimidin (0,95 g) und Hexadecylbromid, 0,01 Mol (3,05 g) werden in 20 ml Methanol unter Rühren und Stickstoff bei 20°C 24 Stunden in Gegenwart von katalytischen Mengen (0,5 mg) Natriumamid umgesetzt. Das entstandene N-Hexadecyl-5-aminopyrimidinium-bromid wird in Aceton bei 76°C gelöst, und nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur kristallisiert das N-Hexadecyl-5-aminopyrimidinium-bromid mit Schmelzpunkt 122°C. Ausbeute 35 %. 0,01 Mol von diesem N-Hexadecyl-5-aminopyrimidinium-bromid (3,20 g) werden im Methanol/Wasser 50/50 (v/v) bei 0°C im Eisbad mit 1 g NaNO₂ und 0,1 ml konzentrierter Bromwasserstoffsäure unter Stickstoff 6 Stunden gerührt. Danach wird das Gemisch auf Raumtemperatur gebracht und anschließend bei 80°C am Rückfluß für 2 Stunden unter Stickstoff und Rühren erhitzt. Das entstandene Hexadecylpyrimidinium-bromid wird mit 2-Ethoxyethanol extrahiert und bei 10°C zum Auskristallisieren gebracht. Ausbeute 30 %, Schmelzpunkt 105°C (Bromid) 189°C (Chlorid).

Präparative Trennung von nichtumgesetzten Produkten kann auch durch Hochdruckflüssigkeitsschromatographie erreicht werden, wie bei den Pyridiniumabkömmlingen beschrieben.

2.) In 2,5,6-Stellung substituierte Pyrimidiniumverbindungen werden durch Umsetzung in 2-Ethoxyethanol unter Druck im Autoklaven bei 100°C bei einer Reaktionsdauer von 8 Stunden aus den entsprechenden n-Alkylbromiden bzw. Jodiden und den substituierten Pyrimidinverbindungen mit Ausbeuten zwischen 30 und 40 % erhalten. Die Umkristallisationen werden für alle substituierten Pyrimidiniumverbindungen aus Chloroform vorgenommen.

Präparative Trennung von nicht umgesetzten Produkten kann wie vorne beschrieben durch Hochdruckflüssigkeitsschromatographie erreicht werden.

3.) N,-n-Alkyl-Verbindungen des Pyrimidins können durch Umsatz von n-Alkyl-Mgx (x = Br, Cl) in guten Ausbeuten mit Pyrimidin oder 2,6,5,6-substituierten Pyrimidinen in Gegenwart von 1,2-Dimethoxyethanol und/oder n-Heptan erhalten werden. Es findet kein Hetarin oder Additions-Eliminations-oder Eliminations-Additions-Mechanismus statt.

0,01 Mol (1,0 g) 5-Fluor-pyrimidin werden in 1,2-Dimethoxymethan (100 ml) unter Rühren im Dreihalskolben und unter Stickstoff gelöst. Aus einem Tropftrichter läßt man 0,08 Mol (gleiche Größenordnung wie oben) n-Decylmagnesiumchlorid (oder 0,09 Mol \rightarrow 29,6 g n-Hexadecylmagnesiumbromid), gelöst in 20 ml

Heptan bei 20°C langsam zutropfen. Diese Lösung wird auf 40°C gebracht, für 12 Stunden gerührt und nach abgeschlossener Reaktion werden aus einem Tropftrichter 20 ml 50 Gew.% Bromwasserstoffsäure bei konstanter Temperatur zugetropft. Nach 1 Stunde ist das überschüssige Grignard-Reagenz umgesetzt. Es wird auf 0°C abgekühlt und der evtl. noch bestehende Überschuss von Grignard-Reagenz durch Zusatz von
 5 Methanol ver nichtet und die quartären N₁-Pyrimidiniumbasen durch 2-Ethoxyethanol extrahiert. Die erste Umkristallisation wird aus Chloroform/Methanol bei 0°C durchgeführt, die weiteren Umkristallisationen bei Raumtemperatur.

Schmelzpunkt: 5-Fluor-N₁-decylpyrimidiniumbromid 199°C (Zers.)

Schmelzpunkt: 5-Fluor-hexadecylpyrimidiniumbromid 175°C (Zers.)

10

c) Herstellung der 7-n-Alkyl-imidazolium 4,5-d pyrimidinderivate (Purin), z.B. 7-Hexadecyl-imidazolium-2,6-dihydroxy[4,5-d] pyrimidinbromid

15 1,5 g 2,6-Dihydroxy-purin (0,01 Mol) werden in 100 ml Aceton im Vierhalskolben bei 35°C gelöst. Aus zwei Tropftrichtern werden unter Rühren und Stickstoff einmal Triethyl-oxoniumborfluorid (Et₃O⁺BF₄⁻) in dreifachem Überschuss (5,7 g = 0,03 Mol) gegenüber n-Hexadecylbromid (3,3 g, 0,01 Mol), das sich in dem zweiten Tropftrichter befindet, gleichzeitig mit n-Hexadecyl-Br zugetropft. Die Reaktion wird unter
 20 stetem Rühren über 6 Stunden bei 40°C gehalten und anschließend 10 Stunden bei 65°C am Rückfluß gekocht. Nach Abschluß der Reaktion setzt man 100 ml Ethanol zu, filtriert die gebildete quartäre Ammoniumbase über einen Glassintertiegel (1G4) ab und kristallisiert aus einem Gemisch bestehend aus 2-Ethoxyethanol/Chloroform, 1:1 um . Ausbeute: 0,5 g, Schmelzpunkt: 122°C.

Die Verbindung ist hygroskopisch und bildet ein kristallines Addukt mit zwei Teilen Chloroform.

Die UV-Spektren zeigen die typischen Absorptionseigenschaften der Purinderivate. Desgleichen die ¹H-

25 NMR -Spektren, gemessen in d₆-ME₂SO.

d) Die entsprechenden Benzothiazole- und Benzimidazol-n-Alkyl-Verbindungen, vor allem wenn sie in der 2-Stellung halogeniert sind, bilden sich nach diesem Verfahren mit einer Ausbeute von 50 % und sind sehr leicht aus Chloroform umzukristallisieren.

30 e) Die entsprechenden quartären Salze des Pyrazols lassen sich ebenfalls nach dem Verfahren c) herstellen. Auch kann nach Verfahren b3) durch Einsatz von n-Hexylmagnesiumbromid bzw. n-Alkylmagnesiumchlorid arbeiten, da weder ein Additions-Eliminations- noch ein Eliminations-Additions-Mechanismus abläuft. Die 4-H-Pyrazoliumsalze mit R = CH₃, OH, H bilden sich mit hoher Ausbeute von 60 %.

Da der n-Alkylrest sowohl am N₁ wie auch am N₂ oder beides lokalisiert sein kann, ist es notwendig, das Reaktionsprodukt durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf eine RP-18-Säule in einem
 35 Aceton/Acetonitril-Elutionsgemisch zu trennen wie vorne beschrieben. Dies ist auch notwendig, wenn das entsprechende n-Alkylbromid im Bombenrohr oder Autoklaven mit einem Pyrazolabkömmling bei 100°C in Gegenwart von Piperidin zur Reaktion gebracht werden. Das Verhältnis von Di-N-substituierten zu Mono-N₂-substituierten Pyrazoliumabkömmlingen verhält sich wie 1,5:1.

40 f) Die Imidazolium-Verbindungen, die N₁-substituierten wie auch die N₁, N₂-disubstituierten lassen sich wie die entsprechenden Pyridiniumverbindungen herstellen.

Zur Herstellung der N₁-substituierten Imidazolium-Verbindungen verfährt man wie unter b3) beschrieben. Die Ausbeuten liegen bei 30 %. Als geeignetes Reaktionsmedium empfiehlt sich Aceton.

g) Die Quartärnisation des Pyrazins am N₄, wenn in 2-Stellung substituiert ist, erfolgt mit 50%iger Ausbeute, Wenn in 2-Stellung z.B. ein Chlor oder eine Carboxamid (Carbamoyl-) Gruppe angesiedelt ist.
 45 Wenn gemäß Vorschrift b1) verfahren wird, erhält man Ausbeuten von 20-30 % je nach Größe des Alkylrestes. Verfährt man nach der bekannten Herstellung von Pyridiniumverbindungen (a) erhöhen sich die Ausbeuten auf 50 %.

Wie gewöhnlich und vorne ausgeführt bestimmt die (CH₂)_x-Kette mit X = 10-20 die Größe und die KMK in wässrigen Lösungen. Die gebildete Größe, Form und Molekulargewichtsverteilung der Micelle in wässriger
 50 Lösung bei pH < 7,0 wird nach der Natur des Gegenions Y⁻ bestimmt.

Die kovalent gebundenen pharmazeutischen Wirkstoffe können z.B. auf 9-β-Arabetino-1,4-adenin, 5-Fluor-cytosin, Acaturidin, 6-Mercaptopurin oder Thioguanin ausgedehnt werden. Hierzu gehören auch die Nukleoside bzw. Nukleotide der Thymidin-Reihe, die das Wachstum von neoplastischen Tumoren hemmen, u.a. durch Inhibierung der DNS-Synthese. Auch die antiviralen Stoffe der 1,3,5-Triazine, z.B. das 2-Acetamido-4-morphino-1,3,5-Triazin, welches virustatische Eigenschaften gegen Herpes zoster besitzt, sind zu nennen.
 55

Tabelle 2.

Charakteristische Eigenschaften der N^θ-Tenside der allgemeinen Formel IET N^θ≡(Cl₁)_x-Cl₂ y^θ

| Nr. | IET N ^θ ≡(Cl ₁) _x -Cl ₂ | y ^θ | Ep °C | Analyse (%) gefunden | | | K _{HK} × 10 ⁻⁶ M |
|-----|--|---------------------------|-------------|----------------------|-------|-------|--------------------------------------|
| | | | | C | H | N | |
| 1. | Hexadecyl-4-lydroxy-pyridinium | Br · 1/2 H ₂ O | 85 | 59,86 | 10,94 | 4,37 | 24,83 |
| 2. | Dodecyl-pyridinium | Cl · H ₂ O | 73 | 71,46 | 11,20 | 4,90 | 1,52 |
| 3. | 2-lydroxy, 6-amino-hexadecyl-pyrimidin | Cl | 155 | 61,45 | 18,69 | 10,76 | 9,10 |
| 4. | Hexadecyl-pyrimidin | Br | 105 | 62,02 | 10,09 | 7,25 | 2,50 |
| 5. | 2,6-Dihydroxy, 5-Fluor, hexadecyl-pyrimidin | Cl · 2 H ₂ O | 172 | 61,13 | 22,68 | 7,14 | 9,05 |
| 6. | 2-lydroxy, 5-methyl, 6-amino-hexadecyl-pyrimidin | Br | 192 | 56,18 | 16,67 | 9,36 | 1,00 |
| 7. | Dodecyl-pyrimidin | Cl | 85 | 64,79 | 13,78 | 9,45 | 1,20 |
| 8. | 2,6-Dihydroxy-dodecyl-pyrimidin | Br | 70 | 53,07 | 17,12 | 7,75 | 22,06 |
| 9. | 2-Carboxamid-4-hexadecyl-1,4-diazin | Cl | 195 (Zers.) | 71,30 | 6,77 | 11,89 | 0,30 |
| 10. | 7-Hexadecylimidazolium-2,6-dihydroxy [4,5-d]pyrimidin | Cl · 1 H ₂ O | 112 | 60,80 | 17,13 | 13,51 | 0,50 |

Fortsetzung Tabelle 2

| | | | | | | | | |
|-----|---|---------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 11. | 7-Hexadecylimidazolium-2,6-diamino-[4,5-d]pyrimidin | Br · 1/2 H ₂ O | 170 (Zers.) | 55,17 | 8,93 | 18,41 | 17,49 | 1,30 |
| 12. | 3-Hexadecylbenzimidazolium | Cl · H ₂ O | 100 | 72,53 | 10,80 | 7,35 | | 6,70 |
| 13. | 4-Methyl-2-hexadecylpyrazolium | Cl | 172 | 69,67 | 11,89 | 8,14 | | 0,70 |
| 14. | 5-Methyl-1-hexadecylimidazolium | Cl | 142 | 69,69 | 11,89 | 8,12 | | 3,90 |
| 15. | 3-Hexadecylthiazolium | Br · 2 H ₂ O | 155 | 58,20 | 17,83 | 3,59 | | 0,91 |
| 16. | 2,5-Dimethyl-3-hexadecylthiazolium | Br · 1 H ₂ O | 170 (Zers.) | 57,15 | 20,50 | 3,34 | 19,01 | 15,00 |
| 17. | 3-Hexadecyl-6-methyl-benzimidazolium | Cl · 2 H ₂ O | 119 (Zers.) | 69,81 | 14,13 | 7,09 | | 17,00 |
| 18. | 3-Dodecyl-6-methyl-benzimidazolium | Br · 1 H ₂ O | 98 | 59,40 | 12,52 | 7,29 | | 7,30 |
| 19. | 3-Hexadecyl-5,6-dihydroxybenzthiazolium | Cl · 2 H ₂ O | 70 | 60,60 | 28,54 | 3,07 | 7,79 | 7,90 |
| 20. | 3-Dodecyl-benzthiazolium | Br · 1 H ₂ O | 90 | 70,20 | 14,57 | 4,31 | | 10,90 |

Tabelle 3

Ausbeuten und hydrodynamischer Radius von N-Tensiden der Formel
 $\text{HET} = {}^{\ominus}_9\text{N}(\text{CH}_2)_x\text{-CH}$, und Benzethonium Abkömmlinge in Abhängigkeit
 von γ

| Nr. | Tensid | Gegenion γ^{\ominus} | $\langle R_H \rangle$ (Å) | Ausbeute (%) |
|-----|---|---|--|----------------------------------|
| 1 | N-Cetyl-4-methyl- imidazolinium | Br^{\ominus} Cl^{\ominus} NO_3^- | 140,0 70,0 20,0 | 60 70 |
| 2 | N-Hexadecyl-4-cetyl- imidazolinium | Cl^{\ominus} HSO_4^- | 100 150 | 40 30 |
| 3 | N-Hexadecyl-5-carboxamid- pyridinium | Br^{\ominus} Cl^{\ominus} Fumarat Maleat | 120,0 55,0 70,0 120,0 | 60 60 70 30 |
| 4 | 8-Ketohexadecylpyridinium | Cl^{\ominus} Br^{\ominus} NO_3^- | 50,5 140,0 170,0 | 00 80 100 |
| 5 | Methyl-3-stearyl-oxy-propyl- pyridinium | Cl^{\ominus} Salizylat | 140,0 1000,0 | 60 60-80 (20,25°C) |
| 6 | Cetyl-2,3-dihydroxy-propyl- hexadecyl-pyridinium | Cl^{\ominus} Br^{\ominus} OH^- Maleat | 150,0 180,4 210,4 120,0 | 20 25 30 41 |
| 7 | 3,5-bis [(n-hexadecyloxy-carbonyl)- N-methyl-pyridinium | Salizylat Fumarat Cl^{\ominus} | 1000 2500 350 | 60 70 50 |
| 8 | a) 2,-4-Dihydroxy-5-methyl- hexadecyl-pyridinium b) 2,-4-Dihydroxy-5-Fluor- hexadecyl-pyridinium | Cl^{\ominus} Br^{\ominus} Br^{\ominus} Cl^{\ominus} | 1000 1500 210 150 | 30 30 30 30 |
| 9 | a) 2-Carboxamid-3-hexadecyl- 1,4-pyridinium b) 2-carboxamid-3-dodecyl- 1,4-pyridinium | Cl^{\ominus} NO_3^- NO_3^- Fumarat | 220 440 366 750 | 30 30 30 30 |
| 10 | 3-[[(Dimethylamino) -carboxyl] oxyl]-1-hexadecyl-pyridinium | Cl^{\ominus} Fumarat Br^{\ominus} | 450 700 1000 | 30 60 40 |
| 11 | 3-hexadecyl-benzimidazo- linium | Cl^{\ominus} Maleat Fumarat NO_3^- SO_4^{2-} | 300 1500 250 500 350 | 50 40 30 70 70 |
| 12 | Benzyl dimethyl [2-[2-(p-1,1,3,3, tetramethylbutyl-p,p'-dimethyl- phenoxy) ethoxy] ethyl] ammonium | Cl^{\ominus} Br^{\ominus} NO_3^- Maleat Fumarat Salizylat | 150 3000 150 3000 2500 3000 | 30 40 10 20 25 20 |

Die folgende Abbildung 6 zeigt die Varianz des hydrodynamischen Radius von Benzethonium-Chlorid und N-Hexadecyl-4-cetyl-imidazolium-salicylat in Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius nach verschiedenen ultraschallbehandelten Zeiten in Minuten, gemessen durch inelastische Laser-Lichtstreuung.

5

Weitere vorzugsweise Ausführungsformen der Erfindung:

Während der Gesamtbereich der kritischen Micellbildungskonzentration (KMK) im Bereich von $1,0 \cdot 10^{-7}$ bis $1,5 \cdot 10^{-4}$ Mol/Liter liegt, liegt die KMK vorzugsweise im Bereich von $1,0$ bis $8,5 \cdot 10^{-7}$ Liter.

Vorzugsweise ist das kationische Tensid mit dem einwertigen Anion in einer Menge von 0,05 bis 0,1 Gew.%, bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zubereitung, enthalten.

Besonders gute Ergebnisse werden erzielt, wenn das kationische Tensid mit dem einwertigen Anion in einer Menge von 0,08 - 0,1 Gew.%, bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zubereitung, enthalten ist.

Vorzugsweise ist der hydrophobe pharmazeutische Wirkstoff in einer Menge von 0,06 - 0,05 Gew.%, bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zubereitung, enthalten.

Besonders gute Ergebnisse werden erzielt, wenn der hydrophobe pharmazeutische Wirkstoff in einer Menge von 0,001 - 0,005 Gew.%, bezogen auf die gesamte pharmazeutische Zubereitung, enthalten ist.

Vorzugsweise Lösungsmittel sind Wasser oder Wasser + Glycerin oder Wasser + Glycerin + Ethanol.

Vorzugsweise ist das einwertige Anion ein monobasischer oder dibasischer Fettsäurerest.

Vorzugsweise ist das einwertige Anion Acetat, Propionat, Fumarat, Maleat, Succinat, Aspartat oder Glutamat.

Vorzugsweise ist das einwertige Anion ein Zuckerrest.

Vorzugsweise ist das einwertige Anion Glukonat, Galacturonat oder Alginat.

Vorzugsweise ist das einwertige Anion Chlorid, Bromid, Jodid oder Hydrogensulfat.

Vorzugsweise ist der hydrophobe pharmazeutische Wirkstoff ein antimikrobieller Wirkstoff oder ein antifungaler Wirkstoff oder ein antiproliferativer Wirkstoff oder ein antiviraler Wirkstoff.

Vorzugsweise ist der hydrophobe pharmazeutische Wirkstoff eine anorganische Verbindung der Elemente Zink oder Quecksilber oder Wolfram und/oder Antimon. Vorzugsweise ist dabei die anorganische Verbindung Zn_2SO_4 oder Zn_2O oder $Hg(CN)_2$ oder $(NH_4)_{12}(NaW_{21}Sb_3O_{88})_{17}$ oder auch ein Alkali- oder Erdalkalisalz der Phosphonsäure $ROP(O)Me_2$ oder auch ein N-Phosphonoacetyl-1-aspartat.

Vorzugsweise ist der hydrophobe pharmazeutische Wirkstoff ein Antibiotikum oder ein antiviraler Wirkstoff oder ein antifungaler Wirkstoff oder ein antineoplastischer Wirkstoff.

Vorzugsweise ist das Lösungsmittel Wasser und/oder Ethanol und/oder Glycerin. Vorzugsweise ist das Lösungsmittel Wasser und/oder Ethanol und/oder Dimethylsulfoxid.

Während der pH-Wert des Lösungsmittels jedenfalls ≤ 7 sein muß, ist der vorzugsweise pH-Wert des Lösungsmittels = 5 bzw. in der Nähe von 5.

Die pharmazeutische Zubereitung kann erfindungsgemäß im wesentlichen dadurch hergestellt werden, daß zunächst in einem Reaktionsgefäß das Lösungsmittel vorgelegt wird, dann das kationische Tensid unter Rühren bei Raumtemperatur zugegeben wird, dann zur entstandenen isotropen micellaren Lösung der hydrophobe pharmazeutische Wirkstoff unter Rühren bei Raumtemperatur zugegeben wird und zu dessen vollständiger Lösung weitergerührt wird.

Besonders günstige Ergebnisse werden mit den kationischen Tensiden der allgemeinen Formel II erzielt, wenn $x = 14$ ist, d.h., wenn die Alkylkette 15 C-Atome aufweist.

Diese geradkettigen C_{15} -Abkömmlinge der N-Tenside zeichnen sich insbesondere aus durch eine einfache chemische Herstellung. Außerdem haben sie überraschenderweise die niedrigste KMK (diese liegt ca. bei $2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol/Liter). Sie sind weiterhin durch Y^- sehr leicht zu steuern (Form, Molekulargewichtsverteilung, Polydispersität). Außerdem sind sie variabel aufgrund ihrer Größe der Alkylkette und daher bezüglich Aufnahme der pharmazeutischen Wirkstoffe. Schließlich zeichnen sie sich durch leichte Kristallisierbarkeit aus.

Wie bereits erwähnt, ist der Rest Hexadecylpyridinium an sich (als reine chemische Verbindung) bekannt. Nicht bekannt ist der erfindungsgemäße Einfluß des zugehörigen Anions (Y^-) auf die Micellengröße und die Form der Micelle. Im Hinblick auf den anmeldungsgemäß beanspruchten unabhängigen Stoffschutz für alle offenbaren neuen Verbindungen wird deshalb im folgenden ein Oberbegriff offenbart, der vorzugsweise erfindungsgemäße neue Verbindungen umfaßt: Dieser Oberbegriff lautet "isoelektronische heterozyklische Stickstoffbasen mit 5- oder 6-Ringen, enthaltend entweder 2 N-Atome in 1,2-Stellung bzw. 1,3-Stellung bzw. 1,4-Stellung oder ein S-Atom in 1-Stellung mit einem N-Atom in 3-Stellung".

Herstellungsverfahren für die pharmazeutische Zubereitung:Generelles zur Herstellung der wässrigen Phase:

- 5 Um vorzugsweise eine monodisperse, homogene und isotrope wässrige Lösung der N⁺-Tenside sowohl in Hinsicht auf Form (sphärisch, oval, langgestreckt) und Größe als auch auf Molekulargewichtsverteilung zu erreichen, müssen die angeführten Lösungen einschließlich ihrer eingeschlossenen hydrophoben pharmazeutischen Wirkstoffe
- 10 a. ultraschallbehandelt werden, z.B. bei 100 Watt, eine Minute, eventuell anschließend dann durch b.
b. durch Säulenchromatographie, z.B. auf einer Agarose A 0,5 m, Sepharose 2 B, Sephadex G 200, DEAE-Sepharose C1-6B bei pH 6,0 oder auf einem Ultragel AcA44 (pH 6,0 - 6,5) oder Bio-Gel 1,5 m bei pH ≤ 7,0 nachgereinigt; oder
- 15 c. auf einem linearen Dichtegradienten, z.B. von 1 -30 Gew.% Subrose, in einer präparativen Ultrazentrifuge in einem SW-27-Rotor bei 25.000 UpM für 12 Stunden zentrifugiert werden. Bei Anwendung einer Zonal-Zentrifugation bei gleichem Gradienten (20°C) können bei 10.000 UpM große Mengen von homogenen Populationen von Micellen und Vesikeln zentrifugiert werden.
- 20 d. DEAE-Zellulose-Säulenchromatographie bei pH 5,0 -6,5 (pH ≤ 7), z.B. durch einen Phosphatgradienten (linear von 0,01M KH₂PO₄/0,01M K₂HPO₄, pH 6,5 bis zu 0,05M KH₂PO₄/0,05M K₂HPO₄ im totalen Elutions-Volumen von 1000 ml) gereinigt werden, bis die entsprechende, gewünschte Population von Micellen bzw. Vesikeln erhalten worden ist.
- So ist es möglich, die gewünschten homogenen Populationen von Micellen oder Vesikeln einschließlich ihrer eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoffe, in Form von wiederholbaren konstanten Molekulargewichten und geometrischen Formen zu erhalten. Dies ermöglicht Monomere der Tenside von den Micellen als auch von nicht eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoffen quantitativ zu trennen.

Herstellung der homogenen, micellaren Lösung in wässriger Phase:

25 Die wässrige Phase kann reines Wasser sein. In der Regel wird jedoch eine wässrige Lösung eines Elektrolyten gewählt. Z.B. kann eine wässrige Lösung aus NaCl oder CaCl₂ (MgCl₂) verwendet werden. Zusätzlich können aktive pharmazeutische Wirkstoffe von genannter Art eingeführt werden, die dann micellar gelöst werden auch eventuell unter Beschallung.

Die meisten Verfahren sind auf eine Einkapselung hydrophiler Wirkstoffe beschränkt. Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, hydrophobe z.B. lipophile anorganische (Hg(CN)₂) und organische Wirkstoffe (Amphotericin B) micellar einzuschließen. Auch können hydrophile Anionen, die pharmazeutische Bedeutung haben, z.B. Salizylat, je nach Natur des N-Tensides (insbesondere der Formel II) an der externen Oberfläche der Micelle eingeschlossen werden.

Die Erfindung kann dazu verwendet werden, um entweder hydrophile oder lipophile Substanzen oder auch beide Substanzen einzuschließen. Im Falle von hydrophoben Wirkstoffen werden diese dann zusammen mit dem N-Tensid der Formel I und II in einem Glycerin/Ethanol-Gemisch, bestehend aus 15 Gew.% Glycerin, 15 Gew.% Ethanol und 70 Gew.% Wasser oder 50 Gew.% Ethanol und 50 Gew.% Wasser gelöst, eventuell geschüttelt bzw. ultraschall behandelt und anschließend auf die wässrige Phase mit einem Gehalt von Glycerin/Ethanol von maximal 15 g Glycerin, 5 g Ethanol in 100 g Wasser verdünnt. Anschließend Gel-Permeationschromatographie oder präparative HPLC-können ungewünschtes Material entfernen und eine homogene, isotrope Lösung liefern. Während hydrophobe Substanzen vornehmlich über eine organische Phase (50 %) und anschließende Verdünnung (Wasser) hergestellt werden, werden hydrophile pharmazeutische Wirksubstanzen vorzugsweise in der wässrigen Flüssigkeit eingesetzt, die zur Dispergierung der micellaren Lösung benutzt werden. Im Bedarfsfalle können jegliche nicht aufgenommene, aktive Wirkstoffe aus der Dispersion unter Anwendung bekannter Techniken, wie z.B. Dialysieren, Zentrifugieren, Gel-Permeationschromatographie entfernt werden.

Die Form und Größe, als auch der Hydratationsgrad der micellaren Lösungen der N-Tenside ist u.a. abhängig von γ^- , weniger von der Struktur des Heterozyklus, wohl aber von der hydrophoben Kettenlänge (CH₂)_x. So können z.B. in Gegenwart von Br⁻ oder Salizylat⁻ große stäbchenförmige Micellen von Hexadecylpyridinium erhalten werden von einer Größenordnung von L = 10.000 Å und einem Durchmesser von 100 - 500 Å, während man in Gegenwart von Chlorid Micellen der Größenordnung von 50 - 100 Å in wässriger Lösung erhält. In diesem Falle gibt die Form und Größe der Micelle die Konzentration des zu verkapselnden (micellar) Wirkstoffes an und gestaltet sich somit umgekehrt wie bei Liposomen.

Der Vorteil der Erfindung gegenüber der Verkapselung bei Liposomen liegt

1. in der Dichtigkeit dieser N-Tenside, welche den micellar gebundenen pharmazeutischen Wirkstoff aufgrund der vorne aufgeführten Kräfte nicht freilassen kann und

2. der Steuerung der Form und Größe der Micellen durch Y^- , damit Steuerung der Aufnahmekapazität an hydrophoben bzw. hydrophilen Wirkstoffen, ohne großen, tiefgreifenden Einfluß des Heterozyklus auf die KMK.

Die erfolgte Bildung der kleinen und großen Micellen der N-Tenside in wäßriger Phase lassen sich anhand von physikalischen Meßmethoden nachweisen, z.B. mit gefriergetrockneten Proben ("freeze fracture") im Elektronenmikroskop oder durch Röntgenkleinwinkel-Streuung, durch dynamische Lichtstreuung, durch Kernresonanzspektroskopie (1H , ^{13}C und ^{31}P), als auch durch Transmissionselektronenmikroskopie. Abb. 2 und 3 zeigen z.B. elektronenmikroskopische Aufnahmen von micellar eingeschlossenem $Hg(CN)_2$ in Hexadecylpyridinium- und Benzethoniumchlorid.

Im Kernresonanzspektrum ergeben sich scharfe Signale mit schwacher Linienbreite, welche einen Hinweis auf die Bildung von Micellen mit einem Durchmesser kleiner als 600 Å liefert. Scharfe Signale bei δ ca. 0,89 ppm ($-CH_3$), δ ca. 1,28 ppm ($-CH_2-$) und δ ca. 3,23 ppm ($-N-(CH_3)_2$) sind z.B. für die Micellen der N-Tenside der allgemeinen Formel I und II charakteristisch. Für eingeschlossene Wirkstoffe in diesen Micellen der N-Tenside ist ein Methylsignal bei δ ca. 0,87 - 0,89 ppm charakteristisch, das jedoch in einem Triplett aufgespalten ist und eine wesentlich geringere Linienbreite hat als das Methylsignal, das als Singlett vorkommt bei $\delta = 0,89$ ppm, welches allerdings nur von der Micelle herrührt.

Diese wäßrigen Phasen, welche die erfindungsgemäß erhaltenen Micellen mit eingeschlossenen Wirkstoffen enthalten, sind Verabreichungssysteme, die sich gegebenenfalls nach Konzentrierung, z.B. durch Ultrafiltration, Ultrazentrifugation oder Lyophilisieren mit anschließendem Auflösen in einer wäßrigen Phase, für die orale (p.o.) oder topische Verabreichung eignen.

Bei oraler Verabreichung können die micellar gebundenen pharmazeutischen Wirkstoffe der N-Tenside der wäßrigen Phase mit pharmazeutisch unbedenklichen Verdünnungsmitteln oder Trägern oder mit üblichen Zusätzen, z.B. Farbstoffen oder Geschmacksstoffen, vermischt und als Sirup oder in Form von Kapseln verabreicht werden.

So besteht eine homogene isotrope micellare wäßrige Lösung vorzugsweise aus einem N-Tensid der Formel II und I mit einem antiviralen Wirkstoff, insbesondere mit $Hg(CN)_2$, oder $ZnSO_4$, ZnEDTA, Idoxuridin, 5-Ethyl-2'-desoxyuridin oder Trifluorthymidin, Amantadin, Rimantadin (α -Methyladamantan) und Viderabin (9- β -Arabino <1,4>-adenin) und Ribavirin (1- β -D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamid) als auch mit 2,6-Di-aminikuban 1,1':3,3'-Bis-cyclobutan oder einfach substituierte 2,6-di-amino-Verbindungen (CF_3, Cl, OCH_3) in Gegenwart oder Abwesenheit von Glycerin/Ethanol dispergiert (20°C; Ionenstärke <0,2 M).

Eine homogene, isotrope micellare wäßrige Lösung besteht aus einem N-Tensid der Formel II und/oder Formel I vorzugsweise mit einem antifungalen Wirkstoff, vorzugsweise mit 5-Fluorcytosin, Clotrimazol, Econazol, Miconazol oder Oxyconazol (Z-Form) als auch mit Amphotericin B, Nystatin und ZnO.EDTA als anorganischer antifungaler Wirkstoff, sowie $Hg_2(CN)_4$ ($Hg(CN)_2$ liegt hier als Polymer vor, wobei das Dimere das zugrundeliegende Bauprinzip ist (in wäßriger Lösung) dispergiert.

Eine homogene, isotrope wäßrige Lösung besteht aus einem N-Tensid der Formel I und/oder der Formel II vorzugsweise mit einem antineoplastischen Wirkstoff, insbesondere 5-Fluorcytid, $Hg(CN)_2 \cdot 4$ (Ascorbat oder Acetylacetonat), Azauridin, Cytarabin, Azaribin, 6-Merkaptopurin, Desoxycytosin, Azathioprin, Thioguanin, Vinblastin, Vincristin, Daunorubicin, Doxorubicin in Gegenwart oder Abwesenheit von Glycerin/Ethanol dispergiert.

Eine homogene, isotrope wäßrige Lösung besteht aus einem N-Tenside vornehmlich der Formel II oder der Formel I vorzugsweise mit Aminoglykoside wie z.B. Canamycin, Gentamycin, Neomycin etc. oder Tetrazyklen, Chloramphenicol oder Erythromycin als bakteriostatische (grampositive) oder Clindamycin (gegen nicht sporenbildende anaerobe Bakterien) oder Rifampicin als bakteriziden, als auch Bacitracin, Tyrotricin und Polymyxine in Gegenwart oder Abwesenheit von Glycerol/Ethanol dispergiert.

Die homogene Mischung kann auch anschließend in Gelen auf der Basis von Alginat, Hydrogelstrukturen wie z.B. Sephadex Agarose, Propyl-zellulose, Propyl-hydroxy-zellulose, in Gegenwart von DMSO, Glycerol dispergiert werden, wobei die pharmazeutischen Wirkstoffe micellar bei den gewünschten Konzentrationen enthalten sind.

Man dispergiert z.B. durch Schütteln, Rühren der wäßrigen Phase oder durch Ultraschallbehandlung, welche die zuvor hergestellte homogene isotrope Mischung enthält. Die Bildung der micellaren Strukturen mit den eingeschlossenen Wirkstoffen, pH \leq 7,0, 20°C, findet spontan, d.h. ohne große zusätzliche Energiezufuhr von außen und mit großer Geschwindigkeit statt. Die Konzentration an N-Tensid der Formel I und II und Einschlußverbindung kann erhöht werden, wenn die KMK um mindestens das Zehnfache überschritten wird in der wäßrigen Phase bei konstantem chemischen Potential und Temperatur.

- Die KMK ist eine variable Größe für die Menge der Monomeren der N-Tenside, welche man in einem bestimmten Volumen Wasser unter Verwendung von pH-Schwankungen $\leq 7,0$ lösen kann. Die KMK, die erfindungsgemäß nicht sehr abhängig ist von der Natur des Gegenions, welches nur die Form bestimmt, da weit oberhalb der KMK gearbeitet wird, kann durch elektrochemische Verfahren (Leitfähigkeit, Potentiometrie) durch Messung der Überführungszellen im Zusammenhang mit den Gegenionen, der Oberflächenspannung, Dampfdruckerniedrigung, Gefrierpunkterniedrigung und osmotischer Druck, Messung der Dichte, des Brechungsindex, der elastischen und unelastischen Lichtstreuung (Diffusionskoeffizienten, Stokes' Radius) und der Viskosität, sowie durch Gelfiltration und Röntgenkleinwinkel-Streuungsmessungen bestimmt werden. Nanosekunden Fluoreszenz als auch die Messung der Fluoreszenzpolarisierung lassen zusätzlich Bestimmungen der Lage der eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoffe durch die N-Tenside der Formel I und II zu, z.B. durch ZnEDTA oder $\text{Hg}(\text{CN})_2$ als Quencher und Amphotericin B als Verstärker. Positronium-Vernichtungs-Messungen an diesen beschriebenen micellaren Lösungen mit den eingeschlossenen Wirkstoffen lassen ebenfalls Aussagen über die Menge (Konzentration) des eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoffes in Abhängigkeit von der Natur und Konzentration von γ^- zu.
- Wässrige Phasen mit einem pH-Wert $>7,0$ werden nach der Dispersion zentrifugiert. Die Neutralisation auf pH $\leq 7,0$ ist notwendig, um eine Zerstörung des Heterozyklus in Formel II als auch des Wirkstoffes und/oder der Micellen unter basischen Bedingungen zu verhindern. Physiologisch gängige und verträgliche Säuren sind z.B. verdünnte wässrige Mineralsäuren und Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure oder organische Säure, z.B. Niederalkansäuren wie Essigsäure oder Propionsäure. Meistens reagieren die wässrigen Phasen der kationischen N-Tenside der Formel I und II sauer bis neutral, können aber auch durch Sörensen-Puffer oder organische Inertpuffer, wie z.B. HEPES, MOPS oder MES auf pH-Werte zwischen 3 und 7,0 genau eingestellt werden.

25 Herstellung der homogenen, micellaren Lösung in nichtwässrigen Phasen:

- Die Auswahl der betreffenden Lösungsmittel ist von der Löslichkeit des betreffenden pharmazeutischen Wirkstoffes darin abhängig. Geeignete Lösungsmittel sind z.B. Methylchlorid, Chloroform, Alkohole, z.B. Methanol, Ethanol und Propanol, Niederalkancarbonsäureester, (Essigsäure-Ethylester), Ether oder Mischungen dieser Lösungsmittel. Nach Herstellen der micellaren Lösung und Zugabe des pharmazeutischen Wirkstoffes, gelöst im organischen Lösungsmittel, wird das organische Lösungsmittel entweder durch die vorne erwähnten Verfahren a. - d. oder durch Abblasen mit Inertgas, z.B. Helium oder Stickstoff, entfernt.

35 Beispiel 1:

- Man löst 10 mg Hexadecylpyridinium-chlorid in 100 ml einer Wasser/Ethanol-Mischung (85:15; w/w) bei 25°C unter Rühren und addiert 10 ml Glycerol. Der pH-Wert sollte um 6,5 sein, kann jedoch mit HCl auf diesen oder einen anderen pH-Wert (=7,0) eingestellt werden. Diese Lösung wird dann auf $20 \pm 0,01^\circ\text{C}$ abgekühlt, anschließend ultraschall-behandelt (Bronson-Sonifier, Mass., U.S.A.) für zwei Minuten bei 10 Watt. Die Bildung der Micellen wird durch Messung des Diffusionskoeffizienten mittels inelastischer Lichtstreuung bestimmt und dann nach der Beziehung

$$(1) \quad D_{20,W}^0 = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta_0 \cdot R_H}$$

| | | |
|--------------|---|-------------------------------|
| T | = | $t^\circ + 273$ |
| η_0 | = | Viskosität des Lösungsmittels |
| k_B | = | Boltzmann-Konstante |
| $D_{20,W}^0$ | = | Diffusionskonstante |

- der Stokes, Radius (R_H) berechnet. In Gegenwart von Cle als Ye sollte er nicht größer als 50 Å, von Bre nicht größer als 1000 Å sein. Zur Bildung von Mikroemulsionen von Micellen bestimmter Größe dispergiert man bei Raumtemperatur (20°C) einen filmartigen Rückstand, den man durch Eindampfen der oben genannten Lösung im Rotationsverdampfer erhält, in 1/10 des ursprünglichen Volumens durch 10-minütiges Schütteln. Man erhält eine leicht opalisierende, wässrige Lösung. Zum Einschluß eines pharmazeutischen Wirkstoffes, z.B. 5-Fluorurazil, Cytarabin oder Idoxuridin können, diese in Wasser schwerlöslichen Substanzen direkt, d. h. in fester Form oder als wässrige Suspension eingegeben werden. So gibt man z. B. Trifluoridin, 1.0 - 3.0 mg, bei 20°C unter Umrühren entweder als Mikroemulsion (Suspension) oder zur

wässrigen micellaren Lösung der quartären Ammoniumbase direkt zu. - Eine quantitative Dosierung dieser genannten Nukleosid- und Adeninnukleosid-Verbindungen kann auch durch Dialyse erreicht werden:

- Die micellare Lösung der vorne genannten Konzentration (gepuffert, ungepuffert, pH \approx 6,0, Ionenstärke variabel, T = 293°K) wird in ein Dialyseschlauch (Fa. Servant oder Pharmacia) gefüllt, verschlossen und unter stetem Rühren bei Raumtemperatur gegen eine eingestellte Lösung von pH \leq 7,0 die das vorne genannte Pyridin- oder/und Adenin-Nukleosid bestimmter Konzentration enthält, für 2 Std. dialysiert. Die Abnahme der Extinktion bei 260 nm mit der Zeit der Dialyse erlaubt die Kontrolle des micellaren Einbaues der vorne genannten Wirkstoffe in den hydrophoben Kern des Hexadecylpyridinium-chlorides (Tab.1).

Tabelle 1: (20°C, pH 5,5)

| Experiment | R_H (Å) (15,0Å) | Konzentration | | Ausbeute | |
|------------|----------------------|------------------------------|-------------------------|----------|-----|
| | | Trifluoruridine mg/100 ml | Idoxuridin mg/100 ml | (%) | |
| 1 | 45,0 | 5 | 7,5 | 95 | 95 |
| 2 | 45,0 | 7,5 | 10,5 | 95 | 98 |
| 3 | 50,5 | 10,0 | 12,5 | 94 | 98 |
| 4 | 60,0 | 12,0 | 15,0 | 96 | 98 |
| 5 | 60,0 | 15,0 | 17,0 | 96 | 97 |
| 6 | 65,0 | 17,0 | 20,0 | 96 | 96 |
| 7 | 71,5 | 20,0 | 21,5 | 100 | 98 |
| 8 | 75,0 | 25,0 | 23,0 | 100 | 100 |
| 9 | 75,0 | 30,0 | 24,0 | 100 | 100 |
| 10 | 78,0 | 50,0 | 30,0 | 100 | 100 |

- Die erfolgte Bildung von kleinen micellaren Gebilden in der vorne genannten Lösung ist im NMR-Spektrum durch die Signale $\delta = 1,25$ (Methylen), $\delta = 0,86$ (Methyl) erkennbar. Durch Inkorporation der vorne genannten pharmazeutischen Wirkstoffe findet je nach Absättigung im hydrophoben Kern eine Verschiebung von $\delta = 1,25$ (Methylen) statt, jedoch nicht von $\delta = 0,86$ (Methyl).

- Die Größe der Micellen kann durch inelastische Lichtstreuung nach Formel (1) leicht bestimmt werden (Tabelle 1). Die Größe, einschließlich der Form und zur Erhaltung einer homogenen und monodispersen Lösung kann auch durch HPLC-Chromatographie, Gelpermeation- und Agarose-Chromatographie erreicht werden. (Abb. 7)

- Eine Konzentration der so hergestellten Micellen kann durch Druckdialyse erreicht werden mittels Fiberglas-Patronen definierter Porengröße. So ist es möglich, nicht nur eine definierte Konzentration an pharmazeutischem Wirkstoff vorzunehmen, sondern auch die Micellengröße, Aggregationsrate, Hydratation (Solvatation) konstant zu halten, da keine Fusion der Micellen ("intermicellar growth") eintritt. D.h. die Zahl der Micellen pro Volumeneinheit mit ihrem eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoff nimmt zu (Konzentration hydrodynamischer Partikeln mit gleichem Molekulargewicht), nicht die Aggregationsrate, noch die Zahl der Eventuell vorliegenden Monomeren, die durch Ultrafiltration abgetrennt werden.

Beispiel 2:

Analog Beispiel 1 löst man pro Versuch 15 mg Benzethoniumchlorid in 150 g Wasser/Ethanol (85/15; w/w) bei 25°C unter Rühren und addiert 0,5 ml Glycerin. Der pH-Wert ist normalerweise zwischen 4,8 und 5,5. Um eine klare, nicht opalisierende Lösung zu erhalten, wird diese Lösung bei 25°C für zwei Minuten bei 20 Watt ultraschallbehandelt. Die Bildung der Micellen definierter Größe ist nach Abkühlen auf 20°C nach fünf Minuten abgeschlossen. Zur Inkorporation der vorne genannten antiviralen Wirkstoffe, z.B. Trifluoruridin, Idoxuridin, kann wie unter Beispiel 1 verfahren werden.

Zum Einschluß von Miconazol (Z-Form) dispergiert man die so hergestellte micellare Lösung in Gegenwart von Miconazol bestimmter Konzentration ultraschallbehandelt (2 Minuten), dann über Agarose chromatographiert, wobei die Micellen mit dem hydrophob eingeschlossenen Z-Miconazol als einheitlicher, monodisperser Peak eluiert werden kann. Die Größe und Konzentration an Wirkstoff kann durch inelastische Lichtstreuung und UV-spektroskopisch bestimmt werden. (Abb. 8)

Analog zum Beispiel 1 kann man 10 mg Benzethoniumchlorid und eine gewünschte Konzentration Z-Miconazol in je 5 ml einer Chloroform Methanol-(3:1)-Mischung lösen, dann konzentrieren durch "hollow fiber pressure dialysis" und anschließend in Wasser oder gewünschtem Puffer dispergieren. Man erhält eine klare wässrige Lösung, welche an Micellen der Größenordnung von $R_H = 60-80 \text{ \AA}$ in Gegenwart von Cl⁻ oder $R_H = 100-1000 \text{ \AA}$ in Gegenwart von Salizylat mit eingeschlossenem Wirkstoff besteht.

Durch Zugabe von 1 % (g/g) Alginat und/oder 5 % (g/g) Dimethylsulfoxid können auch tixotrope Gele mit den vorne genannten eingeschlossenen Wirkstoffen hergestellt werden. Durch Erhöhung der Benzethoniumchlorid-Konzentration, einschließlich der eingeschlossenen Wirkstoffe, bis zu 2 % (g/g) können auch wirksame Öle hergestellt werden.

25 Beispiel 3:

Analog zu Beispiel 1 und 2 können die Gegenionen $Y^{\ominus} = Cl^{\ominus}, Br^{\ominus}$ etc. nach verfahrensgemäßer Herstellung durch Ionenaustauscher Chromatographie an DEAE-Sephadex A 50 oder DEAE-Sephrose oder durch umdialysieren gegen das betreffende bzw. gewünschte Gegenion Y^{\ominus} ausgetauscht werden.

30 a) eine nach Beispiel 1 und 2 hergestellte wässrige micellare Lösung wird auf pH = 7,0 mit 0,01 N NaOH gebracht (20°C). Dies kann entweder durch Titration oder Dialyse gegen 0,01 N NaOH über 10 Std. geschehen. Anschließend erfolgt eine Dialyse gegen 1N Fumarat oder Maleat-Lösung, wobei hier die Na-Salze der Fumar-bzw. Maleinsäure eingesetzt werden können. Die Dialyse ist nach 12 Std. beendet. Ein Verlust an antiviralen Wirkstoffen, die vorne genannt sind, tritt nicht auf.

35 b) eine nach Beispiel 1 und 2 hergestellte wässrige micellare Lösung, pH 6,0, wird auf einer DEAE-Sephadex A 50 (1,0×100 cm)-Säule, die zuvor mit einer gepufferten (0,01 M K_2HPO_4 -Puffer) 0,1 N Salizylatlösung beladen wurde, mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/30 min eluiert (20°C). Das überschüssige Salizylat wird durch Dialyse gegen einen großen Überschuß Wasser/Ethanol/Glycerol (90/5/5; g/g) von dem Säuleneluat beseitigt. Die DEAE-Sephadex A 50 Chromatographie kann auch unter Druck im Gegenstromverfahren mit dem gleichen Lösungsmittelsystem durchgeführt werden. Es resultiert bei der 40 Austauscher-Chromatographie (DEAE-Sephadex A 50, DEAE-Sephrose 2B, 5B, DEAE-Cellulose, hügelig) ein homogener Peak, der nach den Kriterien, die in Beispiel 1 und 2 aufgezeigt worden sind, analysiert werden können. DEAE-Sephadex und DEAE-Sephrose haben den Vorteil, daß erhebliche Mengen an micellaren quartären Ammoniumbasen sowohl gereinigt als auch auf mono-Dispersität geprüft werden 45 können.

Beispiel 4:

50 Analog zu Beispiel 1 wird eine micellare Lösung von Hexadecylpyridinium-chlorid mit folgenden pharmazeutischen Wirkstoffen hergestellt:

100 g Lösung enthalten:

Hexadecylpyridinium-chlorid 0,10 g

Atropin-Hydrochlorid (±) 0,002 g

55 Zink-II-chlorid 0,004 g

Glycerol 10,0 g
 Ethanol 4,894 g
 Wasser 85,0 g
 pH 6,2

5 Diese Präparation hat einen hydrodynamischen Radius von $35,0 \pm 5,0 \text{ \AA}$ und eine Aggregationsrate von $N = 35$, bei einem Molekulargewicht des Monomeren von Hexadecylpyridinium-chlorid von 393,0. Jede Micelle dieses Durchmessers enthält im Durchschnitt 100 μg Zink und/oder 50 μg Atropin (-).

Die Abbildung 9 zeigt die Varianz im hydrodynamischen Radius, R_H , dieser Präparation. Außerdem zeigt es die vorne beschriebene erfindungsgemäße Auftrennung des Racemats Atropin in die optische
 10 Antipoden z.B. Hyocyamin (-). Die micellare Größenverteilung wird durch ZnII-chlorid nicht verändert.

Die Abbildung 10 zeigt die Varianz im hydrodynamischen Radius, R_H , der N-Hexadecyl-4-methylpyridinium-chlorid und N-Hexadecyl-4-methyl-pyridinium-chlorid + Atropin-HCL.

15 Beispiel 5:

Man löst 5 mg 4-(17-Tritriacontyl)-N-methyl-pyridinium-chlorid, 1-2,0 mg Amphotericin B in 10 ml einer Chloroform/Methanol-Mischung (2:1) unter Stickstoff bei 25°C auf und dampft diese Lösung im Rotationsverdampfer ein. Der filmartige Rückstand wird in 5 ml destilliertem Wasser fünf bis zehn Minuten ge-
 20 geschüttelt. Diese Lösung wird anschließend für drei Minuten ultraschallbehandelt bis sie nicht mehr opaleszierend ist. Man kann diese, je nach Bedarf, anschließend durch Zugabe von 0,5 ml eines fünffachen Konzentrates von Phosphat-gepufferter, isotonische Kochsalzlösung auf den pH-Wert von 5,5-6,5, bringen.

Diese so hergestellte Lösung wird in eine gerührte Ultrafiltrationszelle (z.B. Amicon^R) eingefüllt, welche anstatt des Ultrafilters mit einem geradporigen Filter mit einem Porendurchmesser von $0,05 \mu\text{m}$ versehen
 25 ist, in Abwesenheit von Me^{2+} -Ionen ($\text{Me}^{2+} = \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$), so filtriert, daß das Volumen in der Zelle nicht unter 30 ml absinkt. Hierdurch werden Vesikel einheitlicher Größe von $< 50.000 \text{ \AA}$ hergestellt.

Form, Größe und Molekulargewichtsverteilung können wie im Beispiel 1 und 2 ermittelt werden. Das Pyridinium-Amphiphile wird aus den entsprechenden Jodiden mit Silberchlorid in 10 % (v/v) Ethanol-Wasser hergestellt. Die farblosen Kristalle haben einen $F_p = 64^\circ\text{C}$ (aus Aceton umkristallisiert) und kristallisieren
 30 mit einem Molekül Wasser.

¹H-NMR ($\text{CDCl}_3/\text{Me}_2\text{Si}$): δ 0,93, (6H,t,J~4Hz), 1,28 (60 H,m), 2,8 (1H,q,J<2Hz, nicht aufgelöst), 4,75 (3H,s), 7,7-9,5 (4H,m). Charakteristisch ist ein H_2O -abhängiges Signal bei δ 4,4.

Anal: Calc. für $\text{C}_{35}\text{H}_{74}\text{NCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 610,50) C, 76,72; H, 12,55; Cl, 5,81; gefunden: C 76,53, H, 12, 42; Cl, 5,78.

35

Beispiel 6:

Analog zu Beispiel 5 werden 10 mg 3,5-bis [(n-hexadecyloxy) carbonyl] -N-methyl-pyridiniumchlorid
 40 ($F_p = 102\text{-}102,5^\circ$) mit 2,0 mg Amantidin oder Rimantadin in 10 ml einer Ethanol/Wasser-Mischung (1:2) unter Stickstoff bei 20°C gelöst. Nach Ultraschallbehandlung (5 min, 20°C , 10 Watt) können die gebildeten Vesikel mit ihren eingeschlossenen Wirkstoffen Amantidin oder Rimantadin auf einer Sepharose 2B nach Größe und Molekulargewicht getrennt werden, um eine homodisperse Lösung von Vesikeln mit geringer Molekular-Polydispersität zu erhalten. Im ¹H-NMR-spektrum sieht man die deutlichen Signale der Methylen
 45 ($\delta = 1,28$) und Methyl-Protonen ($\delta = 0,86$).

Diese in Beispiel 5 und 6 gebildeten unilamellaren Vesikeln können im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Dazu wird die Vesikel-Dispersion zunächst der "freeze-fracture"-Methode unterzogen. Auch kann durch "negative staining" mittels der zwei Tropfen-Methode auf Formvar oder Kohlegrids durchgeführt werden. Durch diese beiden Techniken ist es zusätzlich möglich, eventuelle Populationen von
 50 Vesikeln sichtbar zu machen.

Auch die unter Beispiel 1 und 2 angewendete Methode der inelastischen Lichtstreuung gestattet es, Form und Größe dieser Vesikel und ihrer eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoff zu bestimmen (Abb. 11).

3,5-Bis [(n-hexadecyloxy)carbonyl]-N-methylpyridiniumchlorid, $F_p = 102,0\text{-}102,5^\circ$ (Aceton). ¹H-NMR
 55 ($\text{CDCl}_3/\text{Me}_2\text{Si}$): δ 0,85 (6H,t,J 5Hz), 1,30 (56H,m), 4,40(4H,t,J<7Hz), 5,03 (3H,s) 9,20(1H,t,J<2Hz), 10,00-(2H,d,J<2Hz).

Analyt. Calc.: $\text{C}_{60}\text{H}_{122}\text{NO}_4\text{Cl}$ (MW 666,47): C 72,10, H 10,88, Cl 5,32; gef. C 71,44, H 10,84, Cl 5,23.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.